

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR WACHSTUMSREGULATION BEI DER
LEBERCARCINOGENESE**

Rainer Galm

Disbui. München
1988

Aus dem Pathologischen Institut der Universität München

Vorstand:

Professor Dr. med. M. Eder

UNTERSUCHUNGEN ZUR WACHSTUMSREGULATION

BEI DER LEBERCARCINOGENESE

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rainer Galm

aus

Memmingen

1988

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. H. Rabes
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. M. Eder
	Prof. Dr. med. G. Paumgartner
Dekan:	Prof. Dr. med. W. Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	21.04.1988

Herrn Professor Dr. med. H. Rabes danke ich sehr herzlich für die Themenstellung, für die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und für wertvolle Anregungen bei der Diskussion der Ergebnisse.

Bei den Mitarbeitern seiner Abteilung bedanke ich mich für die technische Assistenz sowie für viele hilfreiche Gespräche. Stellvertretend seien an dieser Stelle genannt: Frau R. Kerler, Frau M. Metzger, Frau B. Sickert, Frau G. Rode und Frau M. Wendt.

Herr H. Hampe stellte sich freundlicherweise für die photo-technische Bearbeitung der histologischen Abbildungen zur Verfügung.

Ein Teil der Versuche wurde gemeinsam mit Herrn H. Wagner im Rahmen seiner Dissertation mit dem Thema "Einfluß von Phenobarbital auf die induzierte Zellproliferation während der Lebercarcinogenese" durchgeführt. Für die vielen Tips, die er mir während zahlreicher gemeinsamer Diskussionen gab, möchte ich mich herzlich bei ihm bedanken.

Die Untersuchungen wurden mit finanzieller Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft und der Dr. Mildred Scheel-Stiftung für Krebsforschung durchgeführt.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
A. EINLEITUNG	1
B. MATERIAL UND METHODE	17
1. Versuchsansatz	17
2. Versuchstiere und ihre Behandlung	19
2.1. Versuchstiere	19
2.2. Diäthylnitrosamin als Carcinogen	20
2.3. Gewichtskontrolle der Versuchstiere	20
2.4. Partielle Hepatektomie	20
2.5. Hydroxyharnstoffinfusion	22
2.6. ^3H -TdR-Markierung	23
2.6.1. Pulsmarkierung (Injektion)	23
2.6.2. Dauermarkierung (osmotische Minipumpen)	24
3. Herstellung der enzymhistochemischen Präparate	26
3.1. ATPase-Färbung	27
3.2. Kombinierte GGT-Färbung und Autoradiographie	28
4. Auswertung der Präparate	32
4.1. Autoradiographische Auswertung	32
4.2. Bestimmung des EAB-Anteils an der Gesamtfläche	34
4.3. Bestimmung der EAB-Dichte	35

5. Qualitätskontrolle der Auswertung	36
6. Statistische Überlegungen	36
7. Zusatzversuch: Gewichtsvergleich der DÄNA-behandel-	
ten Tiere mit unbehandelten Kontrolltieren	38
 C. ERGEBNISSE	 39
1. Untersuchungen zur Proliferationskinetik	39
2. EAB-Anteil am gesamten Lebergewebe	49
3. EAB-Dichte	56
4. Veränderungen des Körpergewichts DÄNA-behandelter	
Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kontrollratten	67
 D. DISKUSSION	 70
 E. VERGLEICH MIT ERGEBNISSEN BEI PHENOBARBITALBEHANDELTEN	
TIEREN (PARALLELARBEIT VON H. WAGNER)	90
 F. ZUSAMMENFASSUNG	 105
 G. LITERATURVERZEICHNIS	 109

ABKÜRZUNGEN UND BEGRIFFSERKLÄRUNGEN

ATPase	= Adenosin-Triphosphatase
ATPase ⁻	= ATPase-negativ
DÄNA	= Diäthylnitrosamin
DNA	= Desoxyribonucleinsäure
EAB	= Enzymaberrationsbezirk
EAB-Anteil	= $\frac{\text{mm}^2 \text{ Enzymaberrationsgewebe} \times 100}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$
EAB-Dichte	= $\frac{\text{Anzahl der EAB}}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$
GGT	= γ -Glutamyltranspeptidase
GGT ⁺	= GGT-positiv
³ H-TdR	= mit Tritium (³ H) markiertes Thymidin
HU	= Hydroxyharnstoff
i.p.	= intraperitoneal
KG	= Körpergewicht
LD 50	= Letaldosis 50
MI	= Markierungsindex
PH	= partielle Hepatektomie
RNA	= Ribonucleinsäure
mRNA	= messenger-RNA
SD	= Standardabweichung
$\bar{x}$	= Mittelwert

A. EINLEITUNG

Ein wesentliches Charakteristikum eines malignen Tumors ist seine Wachstumsautonomie. Ein maligner Tumor entwickelt sich ohne Koordination mit dem normalen Gewebe und unterliegt regulatorischen Einflüssen nur noch beschränkt.

Die Umwandlung normaler Körperzellen in maligne Geschwulstzellen (Transformation) erfolgt in einem mehrstufigen Prozeß. Rous und Kidd (1941) schlugen aufgrund von Beobachtungen bei der Entstehung von Hauttumoren auf Kaninchenohren eine Stadieneinteilung in Initiation und Promotion vor. Diese Einteilung erscheint nach umfassender Abhandlung durch Berenblum (1975) sehr wahrscheinlich und konnte für die Cancerogenese in vielen Organsystemen bestätigt werden (Übersicht bei Piçot und Sirica, 1980). In der Initiationsphase erfolgt die Umwandlung einer normalen Zelle in eine präneoplastische Zelle; in der Promotionsphase wird diese bzw. die daraus entstandene Zellpopulation zum progressiv wachsenden Tumor (Rous und Kidd, 1941; Berenblum, 1978). Während es sich bei der Initiation um eine irreversible Veränderung handelt, ist die Promotion, zumindest teilweise, reversibel (Glauert et al., 1986; Hendrich et

al., 1986). Vorgänge in der Phase der Promotion sind weitgehend unbekannt. Die präneoplastische Latenzperiode nimmt beim Menschen in der Regel lange Zeit in Anspruch; im Tierversuch läßt sie sich unter bestimmten Bedingungen auf einige Monate verkürzen. Die Promotionsphase soll hier am Beispiel der regenerierenden Rattenleber untersucht werden.

Initiierende Substanzen verändern irreversibel die molekulare Struktur der DNA (Pitot und Sirica, 1980). Zu diesen Stoffen gehört die Gruppe der Nitrosamine. Ihre cancerogene Wirkung wurde erstmals von Magee und Barnes (1956) beschrieben, die feststellten, daß Dimethylnitrosamin in der Leber von Ratten bösartige Tumoren induziert. Seither wurde eine Vielzahl von chemischen Verbindungen auf ihre Cancerogenität untersucht. An unterschiedlichen Versuchstieren zeigte sich, daß viele N-Nitroso-Verbindungen in der Leber und auch in anderen Organen eine maligne Transformation bewirken (Druckrey et al., 1967). Die meisten Carcinogene gehen erst durch Heterolyse (z.B. Alkylnitrosamide) oder durch metabolisch-enzymatische Aktivierung (z.B. Dialkylnitrosamine) in das ultimale Carcinogen über (Miller, 1970). Bei letzteren erklärt sich daraus teilweise auch ihre Organotropie. Während dieses Umbaus werden kurzlebige elektrophile Verbindungen freigesetzt, die mit nukleophilen Posi-

tionen an DNA, RNA und Proteinen kovalente Bindungen eingehen können (Miller und Miller, 1974). In der Carcinogenese scheint dabei der Reaktion mit der DNA entscheidende Bedeutung beizukommen (Magee et al., 1975).

Nitrosamine führen zur Alkylierung nukleophiler Stellen der genannten Makromoleküle (Magee und Farber, 1962). Bevorzugter Bindungsort ist das N-7 des Guanins (Magee et al., 1975), welches allerdings bei der Initiation keine Rolle zu spielen scheint (Swann und Magee, 1968). Die Transformation zur Tumorzelle ist eher auf eine Alkylierung der O⁶-Position des Guanins zurückzuführen (Loveless, 1969). Das Auftreten und die Persistenz von O⁶-Alkylguanin zeigt eine direkte Korrelation zur Entstehung von Tumoren, was zunächst im Gehirn (Goth und Rajewsky, 1974; Kleihues und Margison, 1974) und später auch in der Leber (Nicolli et al., 1975) nachgewiesen werden konnte. Seine Wirkung scheint darin zu bestehen, daß es bei der DNA-Replikation zu falschen Basenpaarungen führen kann (Gerchman und Ludlum, 1973; Pegg, 1977; Mehta und Ludlum, 1978; Abbott und Saffhill, 1979); solche Fehlpaarungen spielen offenbar eine entscheidende Rolle für die Initiation (Rabes et al., 1985). Eine weitere Wirkung der Nitrosamine ist die Erzeugung von Einzelstrangbrüchen in der DNA, denen aber vermutlich keine mutagene Bedeutung zukommt (Bradley et al., 1982).



Für die experimentelle Untersuchung der Lebercarcinogenese hat sich die Verwendung von Diäthylnitrosamin (DÄNA) bewährt. In seiner ursprünglichen Form ist es ein Präcarcinogen; durch Metabolisierung entsteht das ultimale Carcinogen, ein Carbonium-Ion (Miller, 1970). Bei zumindest in niedrigen Dosen geringer Toxizität (akute LD 50 = 280 mg/kg KG; Schmähel et al., 1960) ist es, bei hoher Organspezifität, das am stärksten carcinogen wirkende Nitrosamin (Druckrey et al., 1967). Die dabei entstehenden Tumoren sind fast ausschließlich hepatozelluläre Carcinome (Thomas, 1961). Ein weiterer experimenteller Vorteil von DÄNA liegt in seiner Wasserlöslichkeit (Druckrey et al., 1961). Im Gegensatz zu lipophilen Carcinogenen kann es nicht im Fettgewebe gespeichert werden. Seine Wirkung ist daher vom schwankenden Fettgehalt der Versuchstiere unabhängig und korreliert vermutlich aus diesem Grund gut mit seiner Dosierung (Friedrich-Freksa et al., 1969).

Eine wichtige Rolle bei der Malignomentwicklung spielt die Proliferationsaktivität eines Organs (Farber, 1968). In der adulten Rattenleber werden nur 0,5 - 2 Mitosen in 10.000 Zellen gefunden (Brues und Marble, 1937; Altmann, 1966). Nach einmaliger Carcinogengabe entstehen in ihr nur selten Carcinome (Magee und Barnes, 1962). Reparaturmechanismen beseitigen promutagene

Läsionen, bevor diese in einer der seltenen S-Phasen fixiert werden können. Besondere Bedeutung bei der DNA-Reparatur kommt der 1977 von Samson und Cairns bei Bakterien entdeckten O⁶-Alkylguanin-DNA-alkyltransferase zu, die die Methylgruppe und in geringerem Maße auch die Äthylgruppe vom O⁶-Alkylguanin auf einen Cysteinrest des als Acceptorprotein fungierenden Enzyms überträgt (Olsson und Lindahl, 1980; Pegg et al., 1982, 1983). Bei höheren Carcinogendosen werden allerdings Kapazitätsgrenzen erreicht (Rabes et al., 1982b), da das Enzym nur eine Alkylgruppe aufnehmen kann und folglich bei der Transalkylierung verbraucht wird (Robins und Cairns, 1979; Olsson und Lindahl, 1980; Swenberg et al., 1982; Pegg et al., 1983). Andererseits kann seine Aktivität in der Leber durch eine länger andauernde Gabe bestimmter Carcinogene induziert werden (Margison et al., 1979; Montesano et al., 1979, 1980; Pegg et al., 1981); der Aktivitätsanstieg ist dabei spezifisch für die Hepatozyten (Planche-Martel et al., 1985).

Erheblich anfälliger für die initiiierende Wirkung von Carcinogenen sind proliferierende Leberzellen nach einer partiellen Hepatektomie (Scherer et al., 1972; Scherer und Emmelot, 1976; Columbano et al., 1981). Die DNA-Replikation führt zur Fixierung einer carcinogeninduzierten Läsion, bevor diese durch Reparaturenzyme be-

seitigt werden kann (Craddock und Frei, 1974; Rabes, 1979; Emmelot und Scherer, 1980; Columbano et al., 1981; Rabes et al., 1983). Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, daß die Wahrscheinlichkeit der malignen Transformation stark erhöht ist, wenn sich die Zielzellen zum Zeitpunkt der Carcinogenexposition in der späten G₁- oder frühen S-Phase befinden (in vitro: Bertram und Heidelberger, 1974; Grisham, 1980; in vivo: Rabes, 1983; Müller und Rabes, 1983; Rabes et al., 1986).

In der nun anschließenden Promotionsphase kommt es in den initiierten Zellen zu einer allmählichen Expression des neoplastischen Phänotyps. Als aufeinanderfolgende präneoplastische Entwicklungsstufen beschreiben Farber et al. (1976a) vier Arten veränderter Hepatozytenpopulationen:

1. Areale von Zellen mit aberrierendem Enzymmuster, die nur durch histochemische Methoden von normalen Hepatozyten zu unterscheiden sind (Enzymaberrationsbezirke)
2. frühe hyperplastische Knötchen, die zusätzlich zu den Enzymaberrationen morphologische Zellveränderungen aufweisen
3. späte hyperplastische Knötchen (cytologisch von 2. nicht zu unterscheiden)
4. hyperbasophile Herde, die sich in späten hyperplastischen

schen Knötchen entwickeln und vermutlich die letzte Vorstufe von hepatozellulären Carcinomen darstellen.

Nach Beendigung der Carcinogenzufuhr können sich, bei fortbestehender Genomläsion, Zellen der ersten beiden Stufen zu phänotypisch normalen Hepatozyten zurückbilden (Farber et al., 1976a), was sich beispielsweise am Wiederauftreten zuvor nicht mehr nachweisbarer Enzyme zeigt (Kitagawa und Sugano, 1973; Kitagawa und Pitot, 1975; Kitagawa, 1976; Ogawa et al., 1980). Unter speziellen Versuchsbedingungen (Solt-Farber-Modell der Hepatocarcinogenese; Solt und Farber, 1976) scheinen sich die weitaus meisten präneoplastischen Populationen in diesen Entwicklungsstadien zu befinden, da sie zu über 90 % phänotypisch reversibel sind (Farber, 1980; Enomoto und Farber, 1982; Farber, 1984). Ein erneutes Auftreten der beschriebenen Defekte ist jedoch auch nach langer Latenzperiode möglich (Tatematsu et al., 1983).

Auffällig ist die große zahlenmäßige Diskrepanz zwischen präneoplastischen Zellgruppen und Hepatocarcinomen (Scherer und Emmelot, 1975; Emmelot und Scherer, 1980; Kaufmann et al., 1985). Ob eventuell nur ein kleiner Teil der Läsionen die Fähigkeit hat, sich zu manifesten Tumoren weiterzuentwickeln, ist nicht geklärt (Bannasch, 1986).

Daß sie aber überhaupt als Vorstufen in der Malignomentwicklung zu betrachten sind, liegt aufgrund verschiedener Untersuchungen sehr nahe. So konnte gezeigt werden, daß präneoplastische Populationen und Carcinome ähnliche Enzymaberrationen aufweisen (Emmelot und Scherer, 1980; Farber, 1980; Pitot und Sirica, 1980), innerhalb der Enzymaberrationsbezirke Subpopulationen mit deutlich gesteigerter Proliferation auftreten (Rabes et al., 1972b), in größeren Läsionen das für Hepatocarcinome typische α -Fetoprotein nachgewiesen werden kann (Okita et al., 1974; Sell, 1978; Koen et al., 1983) und Zellen aus hyperplastischen Knötchen in vitro infiltrativ wachsen können (Wanson et al., 1981).

Für die Untersuchung der Frühstadien der Cancerogenese kommt der ersten erkennbaren Entwicklungsstufe, den Enzymaberrationsbezirken (EAB), besondere Bedeutung zu. Seit der Beobachtung von Gössner und Friedrich-Freksa (1964), daß in der Leber DÄNA-behandelter Ratten lange vor den ersten Carcinomen Glucose-6-phosphatase-freie Zellinseln auftreten, wurde eine Vielzahl von verminderten und vermehrten Enzymaktivitäten entdeckt (Übersichten bei Farber, 1980; Pitot und Sirica, 1980; Bannasch, 1986). Gut untersucht sind als negativer Marker der Verlust der ATPase-Aktivität (Schauer und Kunze, 1968; Rabes et al., 1972b; Scherer et al., 1972) und der Gewinn

an GGT-Aktivität (Fiala und Fiala, 1973; Cameron et al., 1978; Laishes et al., 1978; Huberman et al., 1979).

Mit Hilfe des Phosphoglyceratkinase-Mosaizismus konnte gezeigt werden, daß Enzymaberrationsbezirke durch klonales Wachstum aus einer einzigen Zelle entstehen (Rabes et al., 1982a). Bei kontinuierlicher Carcinogengabe entwickeln sie einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Hepatozyten (Rabes und Szymkowiak, 1979), der möglicherweise durch die Resistenz präneoplastischer Zellen gegen die toxische Wirkung der Carcinogene bedingt ist (Farber et al., 1976b). Eine andere Hypothese geht von einer Aktivierung autokriner Wachstumsfaktoren aus (Sporn und Todaro, 1980), wie sie aus einigen menschlichen Tumoren (Todaro et al., 1980) und mittlerweile auch aus Lebercarcinomen von Ratten (Luetteke und Michalopoulos, 1985) isoliert werden konnten. Schließlich führen Barbason und Mitarbeiter (Barbason und Betz, 1981; Barbason et al., 1983) den Wachstumsvorteil präneoplastischer Zellen auf einen Verlust der homöostatischen Proliferationskontrolle zurück.

Der Proliferationsvorteil ist umso größer, je mehr Enzymanomalien ein Aberrationsbezirk aufweist (Pugh und Goldfarb, 1978). Im Laufe der Zeit entwickelt sich eine

gewisse Wachstumsautonomie; nach prolongierter Carcinogenzufuhr werden EAB gefunden, deren Proliferation durch Wachstumsreize wie eine partielle Hepatektomie nicht mehr stimuliert werden kann (Rabes et al., 1970b; Kitagawa, 1971).

Durch die Verabreichung promovierender Substanzen kann die präneoplastische Latenzperiode verkürzt werden. Diese Stoffe können selbst keine Tumoren induzieren, bereits initiierten Zellen aber zur Expression des neoplastischen Phänotyps verhelfen (Pitot und Sirica, 1980). Eine promovierende Wirkung wurde erstmals für Croton-Öl (Berenblum, 1941) und in der Folge für viele weitere Verbindungen nachgewiesen (Übersicht bei Pitot und Sirica, 1980).

In der Rattenleber zeigt vor allem Phenobarbital solche Eigenschaften. Allein gegeben, hat es keinen carcinogenen Effekt (Peraino et al., 1971, 1980; Pereira et al., 1982). Nach vorausgehender Carcinogengabe führt es aber zu einer erheblichen Zunahme der Tumorzinzidenz (Peraino et al., 1971, 1973; Weisburger et al., 1975; Pitot et al., 1978), auch dann, wenn es erst lange nach der Carcinogenzufuhr verabreicht wird (Peraino et al., 1977). Ferner ermöglicht es die Entstehung von Tumoren nach subcarcinogener DNA-Behandlung (Barbason et al., 1983)

und nach Gabe sehr schwacher Carcinogene (Kitagawa et al., 1979) - Bedingungen, unter denen ohne Promotor keine Tumoren auftreten. Phenobarbital führt bei Dauerapplikation zu einer nahezu selektiven Proliferationssteigerung carcinogen-induzierter Zellen (Kitagawa und Sugano, 1978; Schulte-Hermann et al., 1981); normale Hepatozyten werden nur zu einem geringen Mehrwachstum angeregt (Paulini et al., 1971; Tuzcek et al., 1975). Dabei scheinen Zusammenhänge zu bestehen: Ein Verlust der homöostatischen Proliferationskontrolle, angezeigt durch eine Störung der physiologischen mitotischen Tagesrhythmik nach Wachstumsreizen, könnte Ursache dieser geringen chronischen Zellproliferation im Normalgewebe sein und gleichzeitig das nahezu selektive Wachstum präneoplastischer Zellen ermöglichen (Barbason et al., 1983), da diese kürzere Zellzykluszeiten aufweisen als nicht induzierte Hepatozyten (Rabes und Szymkowiak, 1979).

Diskutiert wird auch ein nicht mit Wachstumsstimulation verbundener Promotionsmechanismus. 1983 wurde von Kunz et al. mitgeteilt, daß Phenobarbital die Ploidie der Hepatozyten verändern und chromosomale Nondisjunktion begünstigen kann. Möglicherweise fördert es die Hepatocarcinogenese durch Erzeugung einer Aneuploidie und demaskiert latente Neoplasmen, indem es ein verändertes, heterozygot-rezessives Allel in initiierten Zellen zu ei-

nem homozygoten umwandelt (Kaufmann et al., 1985). Eine endgültige Klärung des Wirkungsmechanismus von Phenobarbital steht allerdings noch aus.

Ein spezifisches Kriterium für die Regulierbarkeit der Zellproliferation während der Carcinogenese ist die Reaktion der Zellen auf Wachstumsreize (Rabes et al., 1970b). Als geeignetes Modell erwies sich die regenerierende Rattenleber nach einer partiellen Hepatektomie (Higgins und Anderson, 1931). In den verbleibenden Leberlappen tritt eine kompensatorische Hypertrophie und Hyperplasie ein (Leduc, 1964; Bucher, 1967). Die ausgelöste Proliferationswelle umfaßt nahezu das gesamte Restparenchym; S- und G₂-Phase sowie Mitose laufen dabei in einem verkürzten Zeitraum ab, der dem der ständig proliferierenden Wechselgewebe entspricht (Stöcker, 1966). Gegenüber dem Ruhezustand werden 100fach erhöhte Mitoseindices gefunden (Cater et al., 1956; Oehlert et al., 1962). Bereits 2 - 3 Wochen nach der Operation hat die Leber das Ausgangsgewicht wieder erreicht (Higgins und Anderson, 1931; Leduc, 1964).

In zellkinetischen Studien wurde festgestellt, daß sich die Hepatozyten nach einer PH etwa 14 Stunden lang in einer präparativen Phase (G₁) befinden, in der die vorbereitenden Synthesen für eine DNA-Replikation ablau-

fen. Zwischen 15 und 18 Stunden nach der Operation tritt ein Teil der Hepatozyten in die S-Phase ein; die höchsten ^3H -Thymidin-Markierungsindices findet man nach 20 - 24 Stunden (Grisham, 1962; Oehlert et al., 1962; Rabes und Brändle, 1969; Rabes, 1978). Werte von maximal 30 - 40 % (Stöcker, 1966) werden dabei aber nicht überschritten, was daran liegt, daß die Hepatozyten - abhängig von ihrer Lage im Lobulus - unterschiedlich schnell in das S-Kompartiment eintreten (Fabrikant, 1968; Rabes und Tuczek, 1970; Tuczek und Rabes, 1973; Rabes et al., 1976).

Durch die Verwendung von S-Phasen-spezifischen Cytostatica, insbesondere von Hydroxyharnstoff (HU), kann ein höherer Synchronisationsgrad dieser Zellzyklusabläufe erzielt werden. Da sich die G_1 -Periode nach einer PH je nach Lage des Hepatozyten im Lobulus bis zu 40 Stunden hinzieht (Rabes und Tuczek, 1970), ist es für eine Synchronisation nötig, eine ausreichende HU-Konzentration über einen genügend langen Zeitraum aufrecht zu erhalten. Aufgrund der kurzen biologischen Halbwertszeit von 80 Minuten (Rabes et al., 1977) ist mit einer einmaligen HU-Injektion eine annähernd vollständige Synchronisierung der Leberregeneration nicht zu erreichen. Ein geeignetes Verfahren ist die intravenöse Dauerinfusion (Rabes et al., 1974, 1975). Durch eine 25stündige HU-

Applikation im Anschluß an eine PH gelingt eine Synchronisation nahezu der gesamten Wachstumsfraktion, wodurch Markierungsindices von 80 % erreicht werden (Rabes et al., 1977).

Der Wirkungsmechanismus von HU besteht in einer Inhibition der Ribonucleosid-Diphosphat-Reductase (Krakoff et al., 1968), wodurch die Reduktion von Ribonucleotiden zu Desoxyribonucleotiden verhindert wird (Neuhard, 1967; Young et al., 1967). Die Folge ist eine Hemmung der DNA-Synthese (Young und Hodas, 1964; Schwartz et al., 1965; Yarbrow et al., 1965). Proliferationsbereite Zellen sammeln sich am G₁-S-Übergang an (Sinclair, 1965; Pfeiffer und Tolmach, 1967). Die Wirkung von HU ist dosisabhängig und reversibel (Philips et al., 1967; Coyle und Strauss, 1970); nach seiner Entfernung treten die angesammelten Zellen synchron in die S-Phase ein (Bhuyan et al., 1973; Rabes et al., 1977). Diese ist gegenüber der normalen S-Phase verkürzt, bei der regenerierenden Rattenleber von 7,6 h (Rabes et al., 1972a) auf 6,5 h (Rabes, 1979). RNA- und Proteinsynthese bleiben von HU unbeeinflusst (Young und Hodas, 1964; Schwartz et al., 1965). Dies führt zu einer Hypertrophie der Hepatozyten, die über das für eine Regeneration normale Maß hinausgeht (Schmidkonz et al., 1977). Auf bereits in der S-Phase befindliche Zellen wirkt HU

schon in geringer Dosierung toxisch (Sinclair, 1965; Philips et al., 1967; Barranco et al., 1974); außerhalb der S-Phase treten Zellschäden erst bei fortgesetzter Blockade auf (Sinclair, 1967; Kim et al., 1968).

Verglichen mit anderen proliferierenden Geweben ist die regenerierende Leber gegen die toxische Wirkung von HU unempfindlich (Schwartz et al., 1965; Philips et al., 1967). Erst sehr hohe Dosen oder Applikation von mehr als 32 Stunden Dauer führen zu ausgeprägten Zellverlusten (Moran und Straus, 1979). Eine 10stündige Infusion, wie sie in dieser Arbeit verwendet wurde, gewährleistet bei geringer Zytotoxizität die Akkumulation des größten Teil der Wachstumsfraktion an der G₁-S-Grenze (Rabes et al., 1986).

Verschiedentlich wurde gezeigt, daß HU Strangbrüche in der DNA (Coyle und Strauss, 1970) und Chromosomenaberrationen (Borenfreund et al., 1964; Oppenheim und Fishbein, 1965; Yu und Sinclair, 1968) hervorruft; dabei entstehen Zellpopulationen mit vermehrtem DNA-Gehalt und Gen-Amplifikationen (Hill und Schimke, 1985). Ein carcinogener Effekt konnte aber nicht nachgewiesen werden (Weisburger et al., 1975; Rabes et al., 1986).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proliferationskine-

tik GGT-positiver (GGT⁺) und normaler Hepatozyten zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH untersucht. Durch Vergleich der beiden Zellgruppen sollte analysiert werden, inwieweit präneoplastische Populationen noch in die Wachstumsregulation des gesamten Zellverbundes eingegliedert sind, bzw. inwieweit sie im Laufe ihrer Entwicklung schon eine gewisse Autonomie erworben haben.

Da sich während der Auswertung Anhaltspunkte für eine Abhängigkeit der Expression der verwendeten Markerenzyme von der jeweiligen Zellzyklusphase ergaben, wurden auch relativer Flächenanteil und relative Anzahl der EAB bezogen auf die Fläche der enzymhistochemischen Schnitte bestimmt.

B. MATERIAL UND METHODE

1. Versuchsansatz

Für die Untersuchungen wurden 3 Versuchsgruppen gebildet (Abb. 1).

Insgesamt 70 Tiere aller Versuchsgruppen bekamen während der ersten 4 Wochen an je 5 Tagen eine intraperitoneale Injektion des Carcinogens Diäthylnitrosamin. Während dieser Zeit wurden sie in Makrolon-Käfigen in Gruppen zu 5 Tieren gehalten.

Nach 28 Tagen wurden sie für weitere 91 Tage in Einzelkäfige gesetzt und beobachtet.

Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Tiere der Gruppe "A" 2/3-teilhepatektomiert. 14 Stunden später erhielten sie eine 10stündige Hydroxyharnstoffinfusion. Direkt nach Absetzen des HU-Blocks, sowie in 1,5-h-Abständen danach, wurde jeweils 3 Tieren eine einmalige Injektion tritiummarkiertes Thymidin verabreicht. Eine Stunde später wurden sie durch eine Überdosis Äther getötet.

Die Tiere der Gruppe "B" wurden bis einschließlich der 2/3-Hepatektomie genauso behandelt wie die der Gruppe

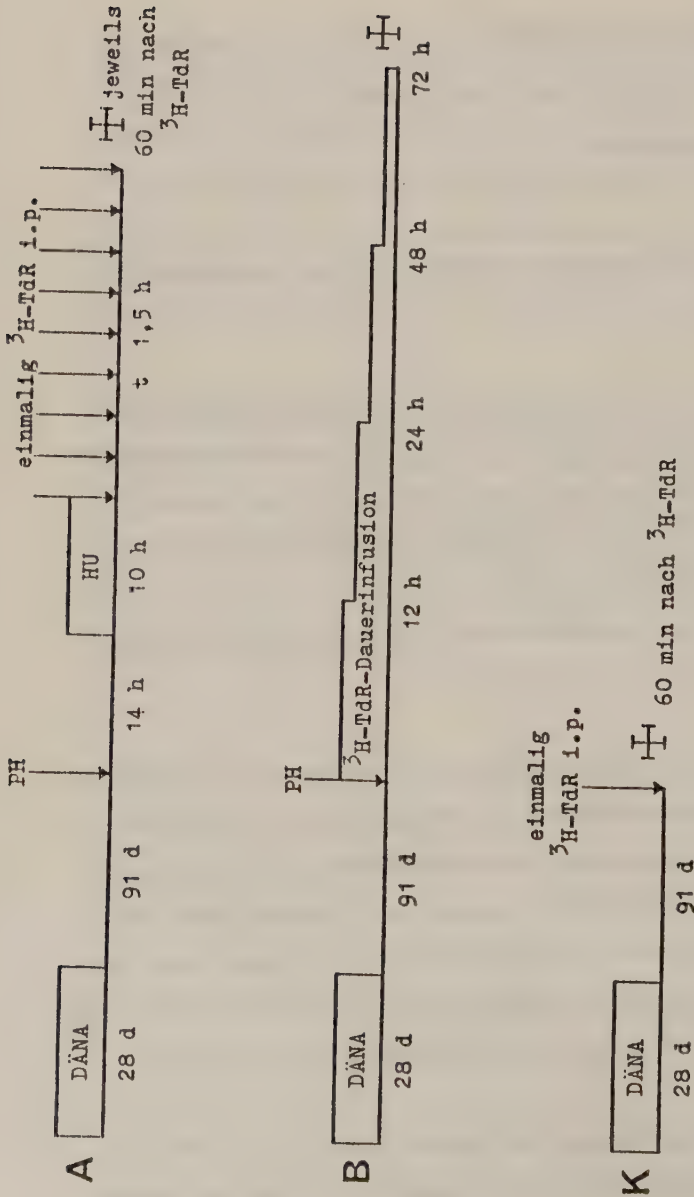


Abb. 1: Schematische Darstellung der Versuchsgruppen (Erläuterung s. Text)

"A", danach aber nicht mit HU dauerinfundiert. Direkt im Anschluß an die Operation bekamen jeweils 3 Tiere eine 12-, 24-, 48- oder 72-stündige ^3H -TdR-Dauerinfusion über eine in den Bauchraum implantierte osmotische Minipumpe. Nach Ablauf dieser Intervalle wurden die Tiere getötet.

Die Tiere der Kontrollgruppe "K" dienten zur Bestimmung der Proliferation ohne vorhergehenden Wachstumsstimulus ("basale Proliferation"). Sie wurden weder hepatektomiert noch mit HU infundiert; ansonsten glich ihre Behandlung derjenigen der Gruppe "A".

2. Versuchstiere und ihre Behandlung

2.1. Versuchstiere

Für alle Versuche wurden männliche Wistar-Ratten (Wistar AF/Han) aus eigener Zucht mit einem Ausgangsgewicht von 95 - 110 g verwendet. Sie wurden bei 12 h-Licht-Dunkel-Rhythmus im klimatisierten Tierstall gehalten und erhielten Altromin^R-Standard-Diät (Altromin Spezialfutterwerke, Lage, Lippe) und Wasser ad libitum.

2.2. Diäthylnitrosamin als Carcinogen

Diäthylnitrosamin (N-Nitroso-diäthylamin, rein 99 %, Serva Feinbiochemica, Heidelberg) wurde in eisgekühlter physiologischer NaCl-Lösung gelöst und in insgesamt 20 Einzeldosen von je 8 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Die Injektionen verteilten sich über 4 Wochen mit 5 Injektionen pro Woche (Montag bis Freitag).

2.3. Gewichtskontrolle der Versuchstiere

Einmal pro Woche wurde das Gewicht aller Tiere kontrolliert, um die jeweils zu applizierende DÄNA-Dosis berechnen zu können und um durch Gewichtsverlust auffallende kranke Tiere rechtzeitig auszusondern.

2.4. Partielle Hepatektomie

Nach der Methode von Higgins und Anderson (1931) wurden in Äthernarkose und mit sterilem Operationsbesteck der Lobus medialis (pars sinistra und pars dextra) und der Lobus sinister lateralis entfernt, was durchschnittlich 70 % des Lebergewichts entspricht (Higgins und Ander-

son, 1931; Anatomie der Rattenleber s. Abbildung 2). Während und kurz nach der Resektion wurde die Durchblutung der im Tier verbleibenden Leberlappen überprüft. Eine livide Verfärbung, die auf eine venöse Stauung hingedeutet hätte, wurde bei keinem Tier festgestellt. Die Operationen wurden grundsätzlich zwischen 6.00 und 10.00 Uhr durchgeführt. Dieser begrenzte Zeitraum wurde gewählt, um tageszeitliche Einflüsse auf die Proliferationsaktivität der Restleber (Jaffe, 1954; Klinge und Mathyl, 1969) gering zu halten. Die durchschnittliche Dauer eines Eingriffs betrug 18 Minuten.

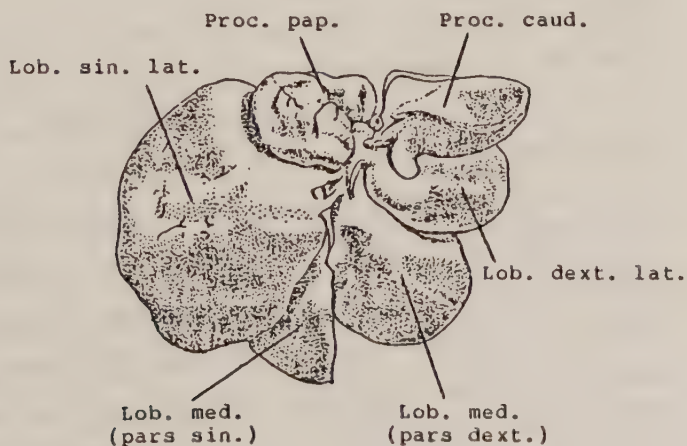


Abb. 2: Leber der Ratte, Viszeralansicht
(aus Hoffmann, 1956)

2.5. Hydroxyharnstoffinfusion

Zwischen 20.00 und 24.00 Uhr, jeweils 14 Stunden nach PH, wurde bei den Tieren der Versuchsgruppe "A" mit der HU-Infusion begonnen (Hydroxyharnstoff, reinst, Serva Feinbiochemica, Heidelberg; gelöst in physiologischer Kochsalzlösung).

Dieser zeitliche Abstand zur Operation erschien sinnvoll, da die Hepatozyten der verwendeten Ratten frühestens 15 Stunden nach der PH in die S-Phase eintreten (Rabes und Brändle, 1969).

Zur Durchführung der Infusion wurden die Tiere in Einzelkäfige mit einer gummiarmierten Öffnung in Bodennähe gesetzt. Unter Äthernarkose wurde der Schwanz durch die Öffnung nach außen geführt, auf der Unterlage fixiert, eine Schwanzvene freipräpariert und kanüliert (genaue Technik bei Iseler, 1977). Um schnell eine ausreichende Wirkstoffkonzentration im Körper zu erreichen, wurde zunächst eine Injektion von 1,69 mmol/kg KG verabreicht. Darauf folgte eine 10stündige Infusion mit einer durch einen Perfusor (Perfusor^R IV, Braun, Melsungen) konstantgehaltenen stündlichen Dosis von 1,25 mmol/kg KG (Flußrate 0,56 ml/h).

Während der gesamten Infusionsdauer hatten die Tiere

freien Zugang zu Futter und Wasser; lediglich der Schwanz blieb fixiert, um einen einwandfreien Sitz der Kanüle zu gewährleisten.

Für die Auswertung wurden nur Tiere verwendet, bei denen die Infusion über den gesamten Zeitraum ordnungsgemäß gelaufen war.

2.6. ^3H -TdR-Markierung

Um DNA-synthetisierende Zellen identifizieren zu können, wurde den Tieren tritiummarkiertes Thymidin (^3H -TdR; Amersham Buchler, Braunschweig) verabreicht.

2.6.1. Pulsmarkierung (Injektion)

Bei den Tieren der Gruppen "A" und "K" sollten jeweils die Zellen autoradiographisch dargestellt werden, die sich zum Zeitpunkt der Markierung in der S-Phase befanden. Zu diesem Zweck wurde die Original-Lösung (1 mCi/ml; spezifische Aktivität 5 Ci/mmol) mit physiologischer NaCl-Lösung auf 0,2 mCi/ml verdünnt und in einer Dosis von 0.8 mCi/kg KG intraperitoneal injiziert. Auf diese Weise eingebrachtes markiertes Thymidin steht dem Körper etwa 20 - 40 Minuten zur Verfügung, wobei

der Hauptteil in den ersten 20 Minuten in die DNA eingebaut wird (Schultze, 1968).

1 Stunde nach der Injektion wurden die Tiere durch eine Überdosis Äther getötet und ihre Lebern sofort entnommen.

2.6.2. Dauermarkierung (osmotische Minipumpen)

Die Tiere der Gruppe "B" erhielten über osmotische Minipumpen (Alzet^R, Modell 2001, Alza Corporation, Palo Alto, Cal., USA) eine ³H-TdR-Dauermarkierung für 12, 24, 48 oder 72 Stunden, um alle Zellen zu erfassen, die während dieser Zeiträume in die S-Phase eintreten.

Die Arbeitsweise der Pumpe wird durch Abbildung 3 verdeutlicht. Sobald sie in wässriges Milieu gebracht wird, saugt das osmotisch wirksame Agens im doppelwandigen Mantel Flüssigkeit durch die semipermeable Außenmembran; diese sorgt auch für die Konstanthaltung des Einstroms. Der so erzeugte hydrostatische Druck komprimiert allmählich die flexible Wand des Wirkstoffreservoirs, wodurch dessen Inhalt über einen Flow moderator kontrolliert zum Ausströmen gebracht wird.

Nach einer Anlaufzeit von 4 Stunden gibt die vollständig gefüllte Pumpe (Nominalkapazität 200 µl) 7 Tage lang eine konstante Menge von 1 µl/h aus ihrem Reser-

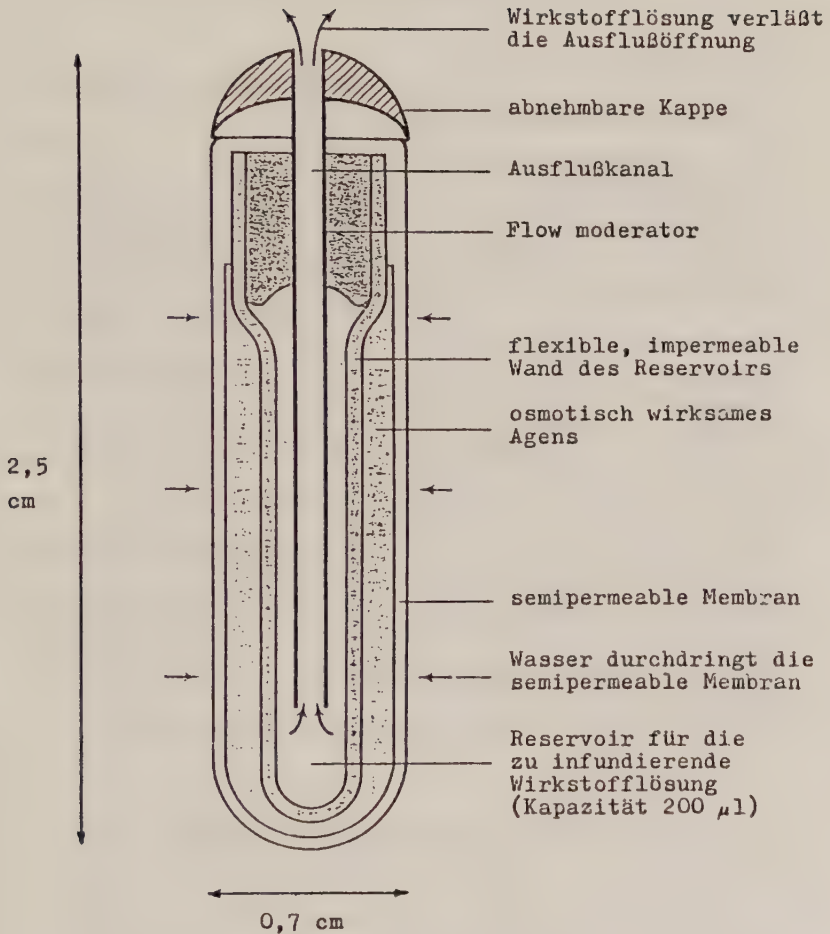


Abb. 3: Aufbau und Funktionsprinzip der Alzet^R-Minipumpe

voir ab (in-vitro-Versuche des Herstellers bei 37°C).

Entsprechend den Empfehlungen des Herstellers wurden die Pumpen bereits am Abend vor ihrem Einsatz mit der ^3H -TdR-Lösung (6,25 mCi/ml; spezifische Aktivität 2 mCi/mmol) gefüllt. Dabei wurde darauf geachtet, daß keine Luft im Reservoir zurückblieb, und zur Kontrolle das Füllgewicht mit dem Leergewicht verglichen. Über Nacht wurden die gefüllten Pumpen bei Zimmertemperatur in physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt.

Am folgenden Tag wurden sie dann direkt im Anschluß an die PH in die Peritonealhöhle implantiert.

Nach Ablauf des Markierungszeitraumes wurden die Tiere sofort durch eine Überdosis Äther getötet und ihre Lebern sowie die Pumpen entnommen. Die osmotischen Minipumpen wurden nach der Explantation innerhalb der Gesamtlaufzeit von 7 Tagen für weitere Tiere verwendet.

3. Herstellung der histologischen Präparate

Lobus dexter lateralis und Processus caudatus der frisch entnommenen Leber wurden jeweils zum einen Teil auf einem Träger mit Kohlensäureschnee tiefgefroren (für die ATPase-Färbung) und zum anderen Teil in eisge-

kühltem Aceton fixiert (für die Darstellung der GGT-Aktivität).

3.1. ATPase-Färbung

Nach dem Tiefgefrieren wurden im Kryostat (Dittes-Duspiva, Heidelberg) bei -14°C von jedem der beiden Leberlappen fünf $8\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte im Abstand von $200\text{ }\mu\text{m}$ hergestellt.

Der histochemische Nachweis des Enzyms erfolgte nach der modifizierten Methode von Wachstein und Meisel (1957). Zunächst wurden 10 mg Substrat (Adenosin-5'-triphosphat, Nr. 15028 NAAH, Boehringer, Mannheim) in 5 ml Aqua bidest. gelöst und mit einer Lösung aus $10,0\text{ ml}$ $0,2\text{ M}$ Tris-Maleat-Puffer (pH-Wert $7,5$), $2,0\text{ ml}$ $0,1\text{ M}$ Magnesiumsulfat, $1,5\text{ ml}$ 2% Bleinitrat und $1,5\text{ ml}$ Aqua bidest. zusammengegeben. Das Gemisch wurde filtriert und im Brutschrank auf 37°C erwärmt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurden die Schnitte 30 min darin inkubiert, anschließend mit lauwarmem Wasser gespült, 2 mal in Aqua bidest. gewässert, 15 sec in 2% Ammoniumsulfidlösung entwickelt, nochmals 2 mal in Aqua bidest. gewässert und 5 min in 10% Formol fixiert. Nach einer abschließenden 10minütigen Spülung in fließendem Wasser wurden die Schnitte mit Glyceringelatine eingedeckt.

In den so angefertigten Präparaten ist die ATPase braunschwarz dargestellt; Zellen, denen dieses Enzym fehlt, weisen eine deutlich hellere Färbung auf (Abb. 4).

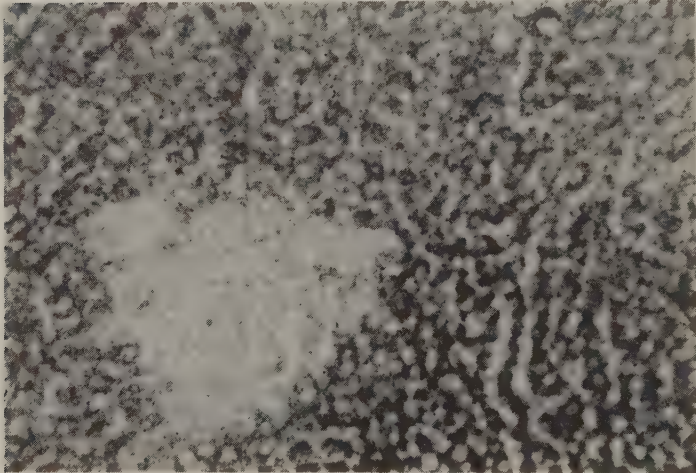


Abb. 4: ATPase-Defektbezirk bei einem Tier der Versuchsgruppe A, 1,5 h nach HU (Vergrößerung 100fach)

3.2. Kombinierte GGT-Färbung und Autoradiographie

Nach 30minütiger Fixierung in eisgekühltem Aceton wurde die Leber 2 h gewässert, durchlief die aufsteigende Alkoholreihe im Autotechnikum (WKF-Forschungsgeräte, Bran-

dau/Odw.) und wurde in Paraplast eingebettet.

Von jedem der beiden Leberlappen wurden drei 1 μ m dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden entparaffiniert, gewässert und 3 mal 1 h in inaktivem Thymidin (2'-Deoxythymidin, 0,1 mg/ml, Merck, Darmstadt) inkubiert, um nicht in die DNA eingebautes radioaktives Thymidin herauszuwaschen.

Die GGT-Färbung wurde nach der Methode von Rutenburg et al. (1969) durchgeführt. Zunächst wurde eine Lösung aus 25,0 mg GMNA (γ -Glutamyl-4-methoxy-2-naphthylamid, Serva Feinbiochemica, Heidelberg), 0,5 ml Dimethylsulf-oxid, 0,5 ml 1 M NaOH und 9,0 ml Aqua dest. hergestellt. Eine Mischung aus 1 ml dieser Lösung, 5 ml 0,1 M Trispuffer (pH-Wert 7,4), 14 ml 0,85 % NaCl-Lösung, 10 mg Glycylglycin und 10 mg Fast-Blue-BBN⁵ (diazotisiertes 4'-Amino-2',5'-diäthoxybenzanilid) wurde im Brutschrank auf 37°C erwärmt. Nach Erreichen dieser Temperatur wurden die Schnitte 30 min darin inkubiert. Anschließend wurden sie 2 min in 0,85 % Kochsalzlösung gespült und für weitere 2 min in eine 0,1 M Kupfersulfatlösung gegeben. Eine erneute kurze Spülung in der Kochsalzlösung und eine Wässerung in Aqua bidest. schlossen die Enzymfärbung ab.

Die Schnitte wurden nun in der Dunkelkammer bei 70 % Luftfeuchtigkeit und 20°C Raumtemperatur nach der Dip-

ping-Methode (Amlacher, 1974) in eine auf 42°C erwärmte und 1:1 mit Aqua dest. verdünnte photoempfindliche Emulsion (Ilford K 2, Essex, England) getaucht. Nach 2stündiger Lufttrocknung wurden sie 14 Tage bei 4°C im Kühlschrank bei vollständiger Dunkelheit exponiert. Im Anschluß daran wurden sie 12 min entwickelt, kurz gewässert, 3 - 5 min fixiert, 20 - 30 min unter fließendem Wasser gespült, in Aqua dest. gewässert und 24 h luftgetrocknet.

Den Abschluß bildete eine etwa 10minütige Kernfärbung mit Hämalalaun (Hämalalaun nach Mayer, Merck, Darmstadt). Sie wurde erst nach der Autoradiographie vorgenommen, um ein Abblässen der Kerne zu verhindern. Die Schnitte wurden nochmals 10 min unter fließendem Wasser gespült, durchliefen die aufsteigende Alkoholreihe und wurden mit Eukitt eingedeckt.

Auf die beschriebene Art und Weise konnten Enzymhistochemie und Autoradiographie an einem Präparat kombiniert werden.

Die GGT war an ihrer rot-orangen Farbe gut zu erkennen (Abb. 5). Die von Hartmann (1981) beschriebene Verschönerung der Färbung nach 24 Stunden wurde hier nicht beobachtet, wahrscheinlich aufgrund der vorangegangenen Aceton-Fixierung. Die Präparate waren noch ein halbes Jahr

nach ihrer Herstellung ohne Schwierigkeiten auswertbar;
erst danach trat in zunehmendem Maße eine Auskristal-
lisierung des Farbstoffes auf (Abb. 6).

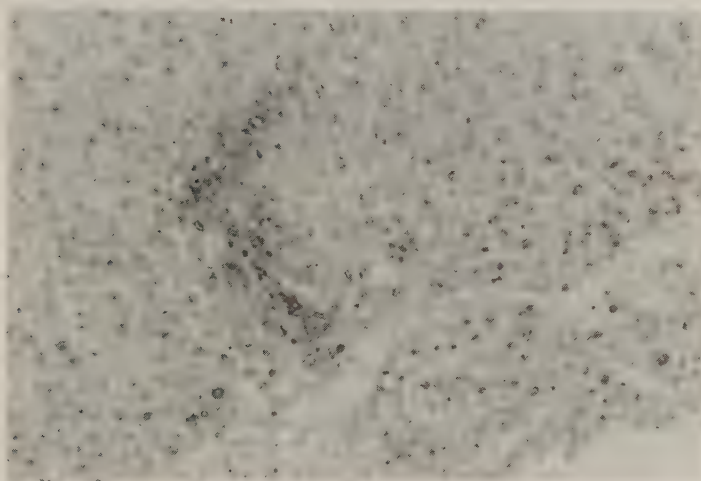


Abb. 5: GGT-positiver Bezirk 3 Wochen nach Her-
stellung des Präparats. Tier der Ver-
suchsgruppe B, 48 h nach PH
(Vergrößerung 150fach)

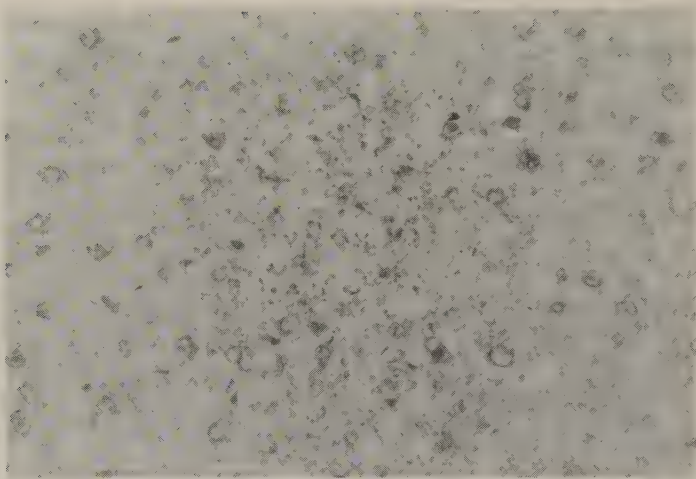


Abb. 6: Auskristallisierte Färbung in einem GGT-positiven Bezirk 3 Jahre nach Herstellung des Präparats. Tier der Versuchsgruppe A, 10,5 h nach HU (Vergrößerung 250fach)

4. Auswertung der Präparate

4.1. Autoradiographische Auswertung

Alle GGT-Präparate wurden mikroskopisch mit Hilfe eines Rasterokulars bei 630facher Vergrößerung ausgewertet (Ölimmersions-Objektiv 63fach, Okular 10fach).

In jedem Präparat erfolgte zunächst die Bestimmung des

Backgrounds. Hierunter ist die Entwicklung von Silberkörnern ohne Einwirkung von Radioaktivität zu verstehen. (Lennartz, 1978). Ursachen sind beispielsweise kosmische Strahlung, elektrostatische Einflüsse, mechanische Einwirkungen beim Aufbringen der Emulsion auf das Präparat u.a.m. (Lennartz, 1978).

Zur Ermittlung des Backgrounds wurde die Anzahl der Silberkörner in einer zellkernfreien Fläche von 500 Rastern des Rasterokulars bestimmt und auf die durchschnittliche Fläche eines Zellkerns umgerechnet.

Anschließend wurde in jedem EAB der ^3H -Thymidin-Markierungsindex (MI) als prozentualer Anteil markierter Hepatozyten an deren Gesamtzahl ermittelt. Andere Zellen, wie z.B. Kupffersche Sternzellen oder Endothelzellen, wurden nicht berücksichtigt.

Als markiert wurde eine Zelle gewertet, deren Kern eine 3fach über dem jeweiligen Background liegende Silberkorndichte, mindestens aber 5 Silberkörner aufwies. Aufgrund des bei allen Präparaten sehr geringen Backgrounds war nur letztere Markierungsgrenze von Bedeutung.

Eine untere Grenze für die Größe eines EAB wurde nicht gesetzt; auch sehr kleine Bezirke, die morphologisch einwandfrei zu erkennen waren (der kleinste bestand aus 4 Zellen), wurden in die Auswertung einbezogen.

Für die Bestimmung des Markierungsindex im Normalgewebe wurden nach den gleichen Auswertungskriterien 2000 Zellen mäanderförmig ausgezählt. Auch hier wurden nur Hepatozyten gewertet.

Eine Auszählung einzeln gelegener markierter und unmarkierter GGT-positiver Zellen schloß die autoradiographische Auswertung ab.

4.2. Bestimmung des EAB-Anteils an der Gesamtfläche

In allen GGT-Präparaten wurden im Mikroskop die EAB aufgesucht und mit Hilfe eines Zeichentubus (Zeiss, Oberkochen) auf ein Blatt Papier übertragen. Je nach Größe des jeweiligen EAB wurde hierfür eine 100fache oder eine 250fache Vergrößerung gewählt (Objektiv 10fach bzw. 25fach, Okular 10fach). Mit Hilfe eines Eichmikrometers wurde für die herausgezeichneten EAB eine 133fache bzw. 333fache Vergrößerung ermittelt.

Die Fläche eines jeden EAB wurde auf einem halbautomatischen Planimetriegerät (Videoplan, Kontron, Eching) bestimmt. Dieses besteht aus einem Magnetmeßtablett mit Auswertestift, einem Computersystem für die Speicherung und Verarbeitung der ermittelten Daten, einem Bildschirm und einem Drucker. Zur Messung wurden die Zeich-

nungen auf das Meßtablett gelegt und mit dem Auswertestift umfahren. Die vom Computer berechneten Flächen wurden unter Berücksichtigung des entsprechenden Vergrößerungsfaktors auf Disketten abgespeichert. Ebenso wie bei der autoradiographischen Auswertung wurde auch hier keine untere Grenze für die EAB-Größe gesetzt.

Die Gesamtfläche jedes einzelnen Schnittes wurde ebenfalls am Videoplan-Gerät bestimmt. Hierzu wurden die Präparate in ein Projektionsgerät (WZFO, Warschau, Polen) geschoben, das die Schnitte direkt auf das Meßtablett projizierte. Ihre Umrisse wurden mit dem Auswertestift umfahren und die ermittelten Flächen unter Berücksichtigung des zuvor bestimmten 10fachen Vergrößerungsfaktors auf Disketten abgespeichert.

Zur Berechnung des EAB-Anteils wurden nun die Flächen aller Bezirke eines Schnittes addiert und die Summe auf seine Gesamtfläche bezogen.

4.3. Bestimmung der EAB-Dichte

Die EAB-Dichte wurde ermittelt, indem die Anzahl der Bezirke eines Schnittes auf seine Gesamtfläche bezogen wurde.

Diese Auswertung wurde sowohl an den GGT- als auch an den ATPase-Präparaten durchgeführt.

5. Qualitätskontrolle der Auswertung

An einer nach Zufallskriterien ausgewählten Stichprobe von Präparaten wurde mit Hilfe des Classification-Programms am Kontron-Computer die Genauigkeit der Auswertung überprüft, indem die Korrelation von Fläche und Zellzahl der EAB bestimmt wurde. Bei konstanter Zellgröße muß zwischen diesen Parametern ein direkt proportionaler Zusammenhang bestehen, was einer Korrelation von 1 entspricht.

Die ermittelten Werte lagen durchwegs über 0,90, so daß von einer exakten Auswertung ausgegangen werden kann.

6. Statistische Überlegungen

Für alle Meßwertgruppen wurden Mittelwert ($\bar{x}$) und Standardabweichung (SD) berechnet (Formeln aus Sachs, 1969); diese Werte wurden der Erstellung von Diagrammen zugrundegelegt.

Mittelwert:
$$\bar{x} = \frac{\Sigma x}{n}$$

Σx = Summe aller Einzelwerte

n = Anzahl der Einzelwerte

Standardabweichung:
$$SD = \sqrt{\frac{\Sigma (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

x = Einzelwert

$\bar{x}$ = Mittelwert

n = Anzahl der Einzelwerte

Modifiziert wurde dieses Verfahren für die Berechnung der durchschnittlichen Markierungsindices der Enzymaberrationsbezirke. Hier wurden jeweils die markierten und die unmarkierten Zellen der EAB aller Tiere eines Zeitpunktes zusammengezählt und daraus ein gemeinsamer Markierungsindex berechnet. Auf diese Weise wurde ein gewichteter Mittelwert erstellt, der die unterschiedliche Größe der einzelnen EAB berücksichtigt.

Um zu prüfen, ob zwischen zwei Meßwertgruppen ein signifikanter Unterschied besteht, wurde ein U-Test bei einem Vertrauensniveau von 95 % durchgeführt. Er vergleicht Median (50 %-Wert) und Interquartilbereich (25 %- bis 75 %-Werte) der beiden Stichproben ohne Voraussetzung einer Normalverteilung.

Der effektivere t-Test würde diese (bei den hier durchgeführten Versuchen nicht gegebene) Normalverteilung erfordern und wurde daher nicht angewendet.

Alle genannten Berechnungen wurden mit Hilfe eines Statistik-Programms am Kontron-Computer durchgeführt.

7. Zusatzversuch: Gewichtsvergleich der DÄNA-behandelten Tiere mit unbehandelten Kontrolltieren

12 Ratten wurden unter denselben Bedingungen wie die Tiere der Gruppen A, B und K im Tierstall gehalten. Sie bekamen jedoch kein DÄNA appliziert.

Einmal pro Woche wurden die Tiere gewogen. Durch Vergleich mit dem Gewicht der DÄNA-behandelten Ratten (Gruppen A, B und K) sollte ermittelt werden, ob die DÄNA-Applikation einen Einfluß auf das Wachstum der Tiere hat.

C. ERGEBNISSE

1. Untersuchungen zur Proliferationskinetik

In einer ersten Auswertungsreihe wurden in allen 3 Versuchsgruppen die Markierungsindices von GGT-positiven Enzymaberrationsbezirken und vom normalen Lebergewebe bestimmt.

Tabelle 1 und Abbildung 7 zeigen die Ergebnisse bei den Tieren der Gruppe "A" (^3H -TdR-Pulsmarkierung).

Sowohl in den GGT-positiven Bezirken als auch im Normalgewebe finden sich direkt nach Beendigung der HU-Infusion so gut wie keine markierten Zellen. Mit zunehmendem Intervall zwischen HU-Block und ^3H -TdR-Injektion nimmt in beiden Fällen der Markierungsindex zu und erreicht 4,5 h nach HU mit 38,1 % (EAB) bzw. 34,8 % (Normalgewebe) ein absolutes Maximum. In der Folge fallen die Werte rasch ab und steigen zwischen 9,0 h und 10,5 h nach HU erneut an, in den GGT⁺ Foci stärker als im Normalgewebe. Da sich 7,5 h nach HU kein EAB finden läßt, kann der Kurvenverlauf in diesem Abschnitt nicht beurteilt werden. In der graphischen Darstellung wurde dies durch eine Unterbrechung der Kurve berücksichtigt.

h nach HU	Tier	Leber- lappen	3H-TDR- MI Normal- gewebe (%)	$\bar{x} \pm SD$ (%)	3H-TDR- MI GGT+ Foci (%)	gewich- teter $\bar{x} \pm SD$ (%)	Gesamt- zellzahl vom Total der Foci	Anzahl der Foci	einzelne GGT- positive Zellen mar- kiert	unmar- kiert
0,0	1	LD	0,0		n.b.		0	0	0	0
	2	PC	0,0		n.b.		0	0	0	0
	3	LD	0,0	0,0	0,0	0,0	176	2	0	7
		PC	0,1	$\pm 0,0$	n.b.		0	0	0	0
		LD	0,0		n.b.		0	0	0	0
		PC	0,0		n.b.		0	0	0	0
1,5	1	LD	7,9		20,0		10	1	0	0
	2	PC	9,1		12,6		151	4	1	5
	3	LD	8,8	9,7	24,5	21,6	469	7	1	12
		PC	11,1	$\pm 1,5$	21,4	$\pm 5,1$	112	1	0	3
		LD	9,7		n.b.		0	0	0	0
		PC	11,8		n.b.		0	0	0	0
3,0	1	LD	29,6		n.b.		0	0	3	0
	2	PC	30,7		n.b.		0	0	0	2
	3	LD	14,7	24,9	n.b.	26,3	0	0	0	0
		PC	42,6	$\pm 11,8$	42,3	$\pm 19,7$	1060	2	4	14
		LD	10,7		42,3		130	1	0	0
		PC	20,9		8,9		1125	1	0	0
4,5	1	LD	37,5		n.b.		0	0	0	0
	2	PC	34,0		n.b.		0	0	0	0
	3	LD	35,0	34,8	n.b.	38,1	0	0	0	0
		PC	37,8	$\pm 2,5$	n.b.		0	0	0	0
		LD	31,7		38,1		176	2	0	0
		PC	32,9		n.b.		0	0	0	0

(Fortsetzung nächste Seite)

h nach HU	Tier	Leber- lappen	3H-TdR- MI Normal- gewebe (%)	$\bar{x} \pm SD$ (%)	3H-TdR- MI GGT+ Foci (%)	gewich- teter $\bar{x} \pm SD$ (%)	Gesamt- zellzahl vom Total der Foci	Anzahl der Total Foci	einzelne GGT- positive Zellen	mar- kiert	unmar- kiert
6,0	1	LD	13,7		16,9		124	2	1	2	
		PC	15,4		10,5		19	1	0	0	
	2	LD	19,6	15,0	n.b.	16,1	0	0	0	0	
		PC	10,5	$\pm 4,6$	n.b.	$\pm 4,2$	0	0	0	0	
	3	LD	10,1		n.b.		0	0	0	0	
		PC	21,1		n.b.		0	0	0	0	
7,5	1	LD	14,9		n.b.		0	0	0	0	
		PC	16,8		n.b.		0	0	0	0	
	2	LD	21,8	16,7	n.b.	n.b.	0	0	2	0	
		PC	25,0	$\pm 5,8$	n.b.		0	0	0	0	
	3	LD	10,6		n.b.		0	0	0	0	
		PC	10,9		n.b.		0	0	0	0	
9,0	1	LD	10,9		n.b.		0	0	0	0	
		PC	14,8		n.b.		0	0	0	0	
	2	LD	19,4	15,7	21,3	21,5	47	1	3	5	
		PC	22,2	$\pm 4,3$	21,5	$\pm 0,1$	745	3	0	1	
	3	LD	12,6		n.b.		0	0	0	0	
		PC	14,5		n.b.		0	0	0	0	
10,5	1	LD	18,1		33,9		1651	10	1	3	
		PC	21,5		n.b.		0	0	0	0	
	2	LD	16,9	19,6	35,5	34,0	584	8	16	13	
		PC	20,7	$\pm 3,1$	26,1	$\pm 7,3$	46	4	0	3	
	3	LD	16,3		24,4		78	2	0	0	
		PC	24,3		42,4		59	1	0	0	

(Fortsetzung nächste Seite)

h nach HU	Tier	Leber-lappen	$^3\text{H-TdR-MI}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$ (%)	$^3\text{H-TdR-MI GGT+ Foci}$ (%)	gewichteter $\bar{x} \pm \text{SD}$ (%)	Gesamtzellzahl vom Total der Foci	Anzahl der Foci	einzelne GGT-positive Zellen
									markiert unmarkiert

12,0	1	LD	15,4		n.b.		0	0	0
		PC	18,9		21,0		143	1	1
	2	LD	17,4	19,4	31,4	26,7	70	1	0
		PC	18,7	$\pm 3,1$	n.b.	$\pm 4,6$	0	0	0
	3	LD	22,7		29,2		209	2	0
		PC	23,3		25,6		43	1	0

Tab. 1: Markierungsindex von GGT-positiven Bezirken und Einzelzellen sowie vom Normalgewebe bei den Tieren der Versuchsgruppe A zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beendigung der HU-Infusion.

LD = Lobus dexter lateralis; PC = Processus caudatus; n.b. = nicht bestimmbar.

Tier	Leber-lappen	$^3\text{H-TdR-MI}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$ (%)	$^3\text{H-TdR-MI GGT+ Foci}$ (%)	gewichteter $\bar{x} \pm \text{SD}$ (%)	Gesamtzellzahl vom Total der Foci	Anzahl der Foci	einzelne GGT-positive Zellen	markiert unmarkiert
------	--------------	---------------------	-----------------------------	-----------------------------------	---	-----------------------------------	-----------------	------------------------------	---------------------

1	LD	0,1		0,0		156	4	0	53
	PC	0,1		0,3		358	4	0	3
2	LD	0,2	0,1	0,7	0,3	151	3	0	0
	PC	0,1	$\pm 0,0$	0,0	$\pm 0,3$	14	1	0	0
3	LD	0,1		0,0		61	1	0	4
	PC	0,1		0,0		18	1	0	0

Tab. 2: Markierungsindex von GGT-positiven Bezirken und Einzelzellen sowie vom Normalgewebe bei den Tieren der Versuchsgruppe K.

s. Tab. 1.

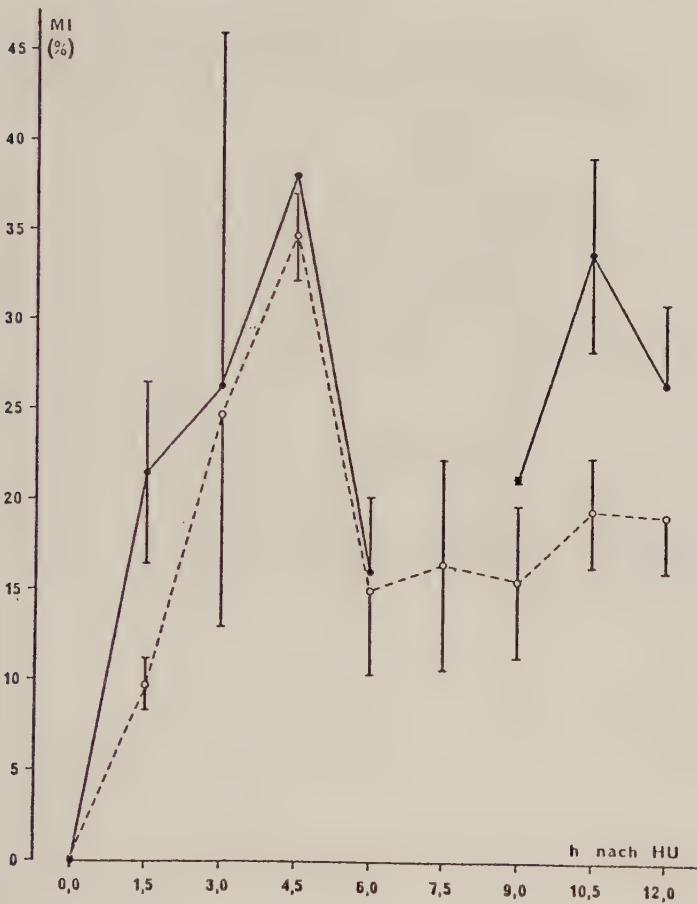


Abb. 7: Mittlerer Markierungsindex $\pm$ Standardabweichung von GGT⁺ Bezirken und Normalgewebe bei der Gruppe A zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU.
Die Standardabweichung wurde nur einseitig eingezeichnet, wenn die Darstellung in beiden Richtungen zu Überschneidungen geführt hätte.

● — ● GGT⁺ Bezirke
○ - - - ○ Normalgewebe

Beim statistischen Vergleich beider Kurven finden sich signifikante Unterschiede nur zu den Zeitpunkten 1,5 h, 9,0 h und 10,5 h nach HU.

Um das Wachstumsverhalten der GGT⁺ Foci nach ihrer Populationsgröße weiter aufzuschlüsseln, wurden die Proliferationsraten der einzelnen Bezirke ihrer Zellzahl in Scatter-Diagrammen zugeordnet. Für diese Auswertung wurden die Zeitpunkte 1,5 h und 3,0 h (Abbildung 8), 4,5 h und 6,0 h (Abbildung 9) sowie 9,0 h und 10,5 h (Abbildung 10) zusammengefaßt. Am Rand eines Schnittes liegende EAB, denen beim Schneiden ein Teil ihrer ursprünglichen Fläche abgetrennt worden war, wurden nicht berücksichtigt.

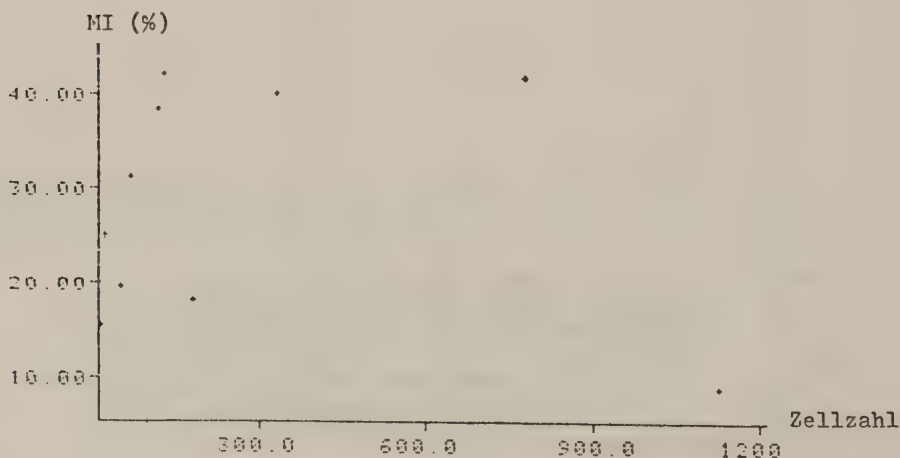


Abb. 8: Zuordnung der Markierungsindices der einzelnen EAB zu ihrer jeweiligen Größe 1,5 h und 3,0 h nach HU.

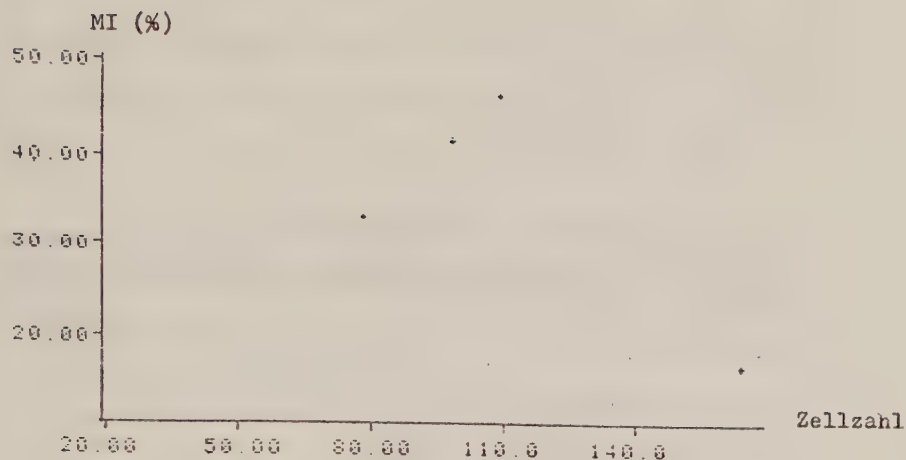


Abb. 9: Zuordnung der Markierungsindices der einzelnen EAB zu ihrer jeweiligen Größe 4,5 h und 6,0 h nach HU.

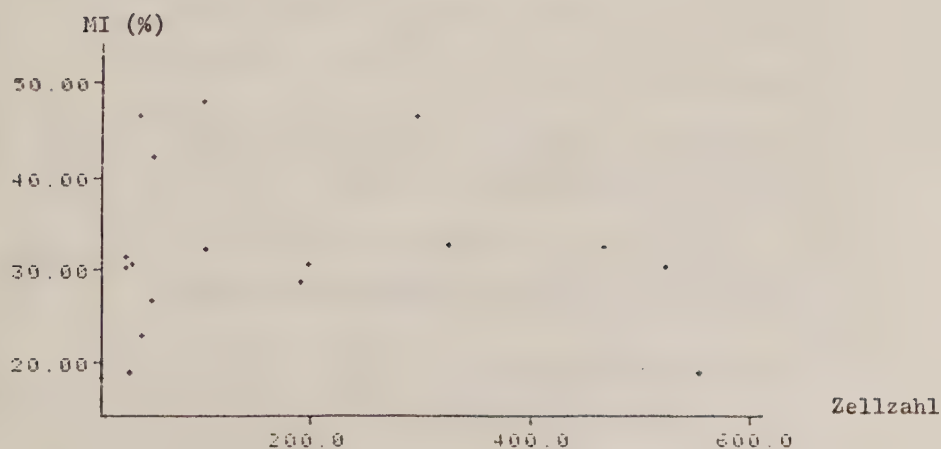


Abb. 10: Zuordnung der Markierungsindices der einzelnen EAB zu ihrer jeweiligen Größe 9,0 h und 10,5 h nach HU.

Alle 3 Diagramme zeigen eine große Streuung der Einzelwerte; ein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern ist nicht ersichtlich.

Die Leber der nicht teilhepatektomierten Kontrolltiere (Gruppe "K") zeigt nur eine sehr geringe Proliferation (Tabelle 2, siehe S. 42). Der mittlere Markierungsindex beträgt hier lediglich 0,3 % in den GGT⁺ Bezirken und 0,1 % im Normalgewebe, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant ist.

Tabelle 3 und Abbildung 11 zeigen die Ergebnisse bei den Tieren der Gruppe "B" (³H-TdR-Dauermarkierung). 12 h nach PH finden sich im Normalgewebe nur sehr wenige markierte Zellen. GGT⁺ Foci treten zu diesem Zeitpunkt nicht auf, so daß hier keine Aussage möglich ist. Beide Kurven zeigen einen steilen Anstieg bis 48 h nach PH auf 74,1 % (EAB) bzw. 62,5 % (Normalgewebe); danach nimmt der Markierungsindex deutlich geringer zu. Der statistische Vergleich beider Kurven ergibt nur zum Zeitpunkt 48 h einen signifikanten Unterschied.

Die Verteilung der einzeln gelegenen GGT-positiven Zellen läßt keine Gesetzmäßigkeiten erkennen, weder innerhalb der 3 Versuchsgruppen noch bei deren Vergleich miteinander.

h nach PH	Tier	Leber- lappen	³ H-TdR- MI Normal- gewebe (%)	$\bar{x} \pm SD$ (%)	³ H-TdR- MI GGT+ Foci (%)	gewich- teter $\bar{x} \pm SD$ (%)	Gesamt- zellzahl vom Total der Foci	Anzahl der Foci	einzelne GGT- positive Zellen	mar- kiert	unmar- kiert
12	1	LD	0,2				0	0	1	0	
		PC	0,1				0	0	0	0	
	2	LD	0,3	0,2		n.b.	0	0	0	0	
		PC	0,2	$\pm 0,1$			0	0	0	0	
	3	LD	0,3				0	0	0	0	
		PC	0,2				0	0	0	0	
24	1	LD	22,1		39,1		256	5	0	0	
		PC	45,3		n.b.		0	0	0	0	
	2	LD	14,2	22,2	26,3	36,1	76	1	0	0	
		PC	16,6	$\pm 12,7$	n.b.	$\pm 9,0$	0	0	0	0	
	3	LD	9,6		n.b.		0	0	0	0	
		PC	25,5		n.b.		0	0	0	0	
48	1	LD	60,3		69,3		446	4	0	0	
		PC	58,3		73,7		1177	14	7	2	
	2	LD	63,4	62,5	79,4	74,1	330	6	0	0	
		PC	65,1	$\pm 2,7$	77,4	$\pm 3,7$	540	6	2	0	
	3	LD	64,8		74,0		1364	15	7	2	
		PC	62,9		71,9		373	6	2	0	
72	1	LD	78,0		81,4		215	1	0	0	
		PC	81,6		92,3		233	1	0	0	
	2	LD	75,5	72,4	82,6	77,8	270	1	0	0	
		PC	59,1	$\pm 8,0$	n.b.	$\pm 9,0$	0	0	0	0	
	3	LD	68,5		70,2		719	2	0	0	
		PC	71,5		n.b.		0	0	2	0	

Tab. 3: Markierungsindex von GGT-positiven Bezirken und Einzelzellen sowie vom Normalgewebe bei den Tieren der Versuchsgruppe B zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH.
s. Tab. 1.

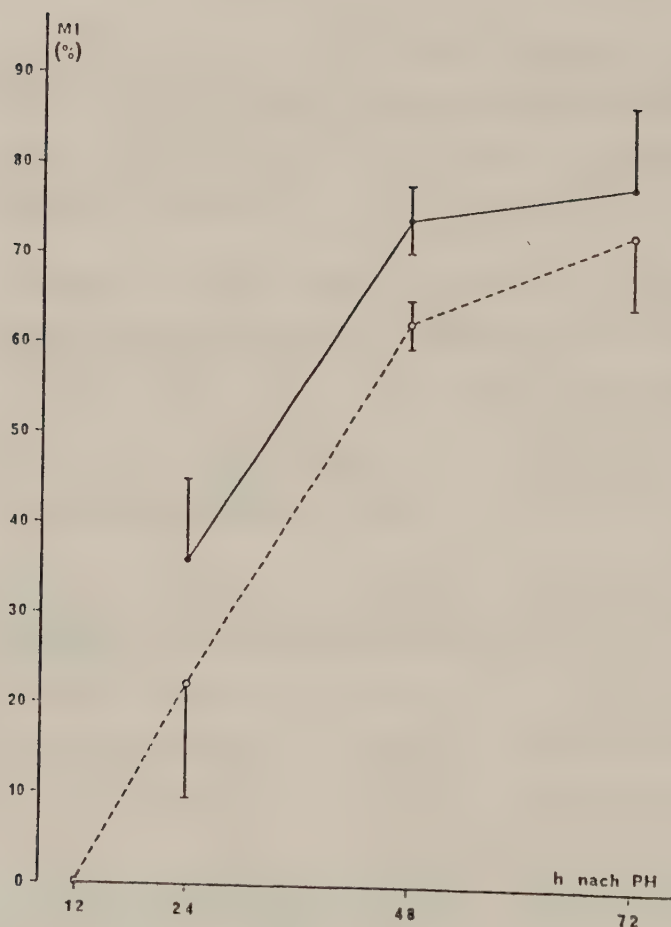


Abb. 11: Mittlerer Markierungsindex $\pm$ Standardabweichung von GGT⁺ Bezirken und Normalgewebe bei der Gruppe B zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH.
Die Standardabweichung wurde nur einseitig eingezeichnet, wenn die Darstellung in beiden Richtungen zu Überschneidungen geführt hätte.

● — ● GGT⁺ Bezirke
○ - - - ○ Normalgewebe

2. EAB-Anteil am gesamten Lebergewebe

In dieser zweiten Auswertungsserie wurde in den GGT-Präparaten der relative Flächenanteil des Enzymaberrationsgewebes an der Gesamtfläche bestimmt.

In Tabelle 4 und Abbildung 12 sind die Ergebnisse bei den Tieren der Versuchsgruppe "A" dargestellt.

h nach HU	Tier	Leber- lappen	$\frac{\text{mm}^2 \text{ EAB} \times 100}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
0,0	1	LD	0,0	$1,5$ $\pm 3,5$
		PC	0,0	
	2	LD	8,7	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
1,5	1	LD	0,1	$3,1$ $\pm 4,4$
		PC	4,4	
	2	LD	11,5	
		PC	2,9	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
3,0	1	LD	0,0	$16,7$ $\pm 34,2$
		PC	0,0	
	2	LD	0,0	
		PC	9,3	
	3	LD	4,8	
		PC	86,2	

h nach HU	Tier	Leber- lappen	$\frac{\text{mm}^2 \text{ EAB} \times 100}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
4,5	1	LD	0,0	$\bar{x} = 3,1$ $\pm 7,6$
		PC	0,0	
	2	LD	0,0	
		PC	0,0	
	3	LD	18,6	
		PC	0,0	
6,0	1	LD	3,5	$\bar{x} = 0,7$ $\pm 1,4$
		PC	0,7	
	2	LD	0,0	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
7,5	1	LD	0,0	$\bar{x} = 0,0$ $\pm 0,0$
		PC	0,0	
	2	LD	0,0	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
9,0	1	LD	0,0	$\bar{x} = 4,5$ $\pm 9,9$
		PC	0,0	
	2	LD	1,1	
		PC	25,9	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
10,5	1	LD	40,4	$\bar{x} = 9,4$ $\pm 15,5$
		PC	0,0	
	2	LD	9,0	
		PC	1,7	
	3	LD	0,8	
		PC	4,6	
12,0	1	LD	0,0	$\bar{x} = 2,7$ $\pm 2,7$
		PC	6,6	
	2	LD	1,8	
		PC	0,0	
	3	LD	5,4	
		PC	2,3	

Tab. 4: Anteil der GGT⁺ Foci an der Gesamtschnittfläche bei den Tieren der Versuchsgruppe A zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU.
s. Tab. 1.

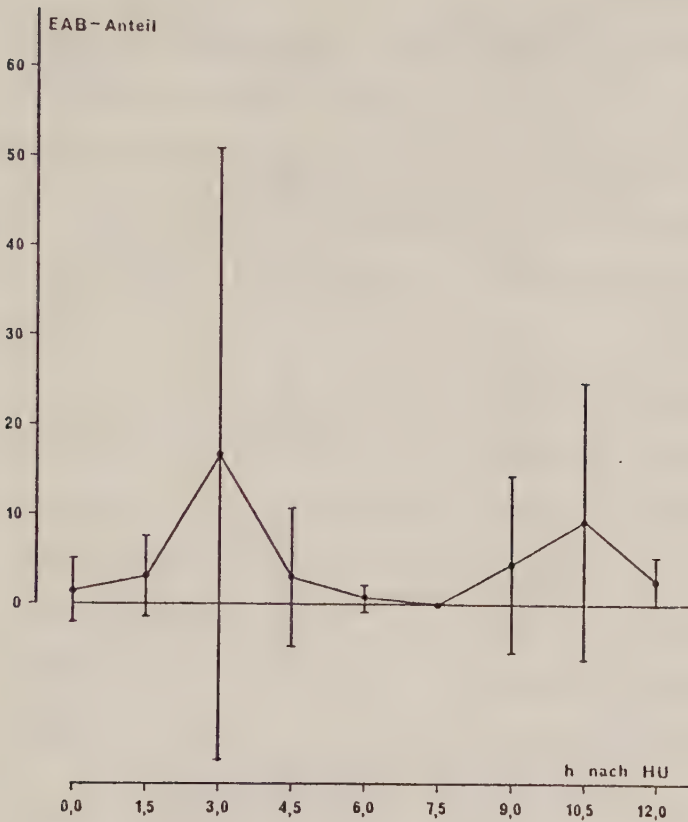


Abb. 12: Mittlerer EAB-Anteil $\pm$ Standardabweichung bei den GGT-Präparaten der Gruppe A zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU.

$$\text{EAB-Anteil} = \frac{\text{mm}^2 \text{ EAB} \times 100}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$$

Die Einzelwerte streuen stark um den jeweiligen Mittelwert, und beim statistischen Vergleich der Zeitpunkte können keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Im Mittel nimmt jedoch der EAB-Anteil zunächst zu, erreicht bei 3,0 h seinen höchsten Wert, fällt in der Folge bis zum Zeitpunkt 7,5 h auf Null ab und steigt dann nochmals an zu einem zweiten Gipfel bei 10,5 h.

Tabelle 5 und Abbildung 13 zeigen die Ergebnisse bei den Tieren der Gruppe "B".

Ausgehend von einem Minimalwert bei 12 h nach PH (hier findet sich kein einziger GGT⁺ Bezirk) steigt der EAB-Anteil bis zu einem Maximum bei 48 h an und fällt danach wieder ab. Signifikant ist dabei nur der Anstieg zwischen 24 h und 48 h.

h nach PH	Tier	Leber- lappen	$\frac{\text{mm}^2 \text{ EAB} \times 100}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
12	1	LD	0,0	$\pm 0,0$
		PC	0,0	
	2	LD	0,0	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	

h nach PH	Tier	Leber- lappen	$\frac{\text{mm}^2 \text{ EAB} \times 100}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
24	1	LD	14,9	$2,9$ $\pm 6,0$
		PC	0,0	
	2	LD	2,3	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
48	1	LD	20,3	$21,2$ $\pm 9,9$
		PC	32,7	
	2	LD	4,0	
		PC	18,2	
	3	LD	27,9	
		PC	24,1	
72	1	LD	7,3	$9,5$ $\pm 12,3$
		PC	31,5	
	2	LD	15,8	
		PC	0,0	
	3	LD	2,7	
		PC	0,0	

Tab. 5: Anteil der GGT⁺ Foci an der Gesamtschnittfläche bei den Tieren der Versuchsgruppe B zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH.
s. Tab. 1.

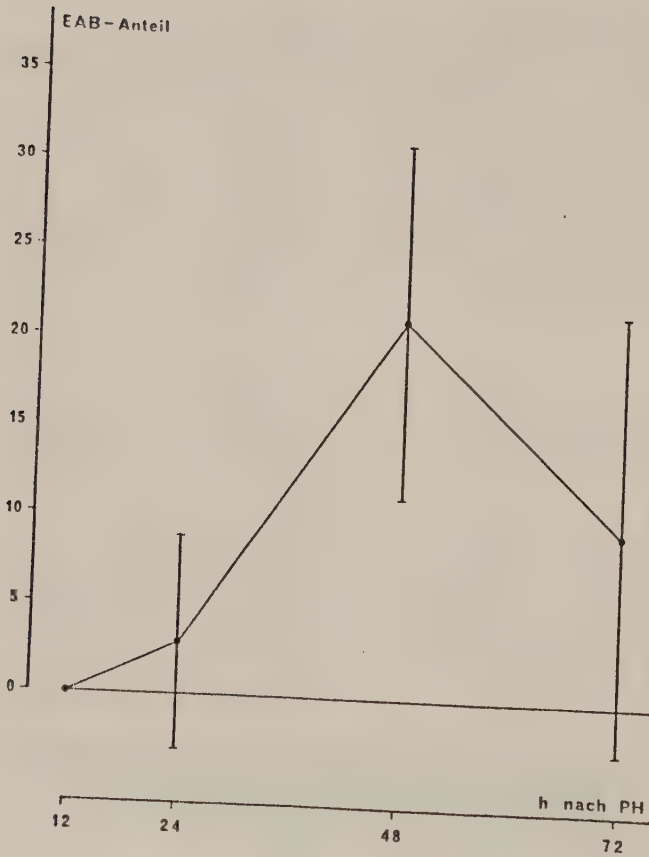


Abb. 13: Mittlerer EAB-Anteil $\pm$ Standardabweichung bei den GGT-Präparaten der Gruppe B zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH.

$$\text{EAB-Anteil} = \frac{\text{mm}^2 \text{ EAB} \times 100}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$$

Die Werte für die Tiere der Kontrollgruppe "K" sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tier	Leber- lappen	$\frac{\text{mm}^2 \text{ EAB} \times 100}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$	$\bar{x} \pm \text{SD}$
1	LD	6,5	5,4 $\pm 8,9$
	PC	23,5	
2	LD	2,4	
	PC	1,0	
3	LD	1,5	
	PC	0,6	

Tab. 6: Anteil der GGT⁺ Foci an der Gesamtschnittfläche bei den Tieren der Versuchsgruppe K.
s. Tab. 1.

Der hier errechnete mittlere EAB-Anteil liegt im Vergleich zu den Ergebnissen der Gruppe "A" etwa am unteren Drittelpunkt zwischen deren Minimal- und Maximalwert, im Vergleich zu den Werten der Gruppe "B" noch etwas niedriger. Im U-Test zeigt sich allerdings nur zum Maximalwert der Gruppe "B" (48 h) ein signifikanter Unterschied.

3. EAB-Dichte

In dieser dritten Untersuchungsreihe wurde die EAB-Dichte als auf die jeweilige Schnittfläche bezogene Anzahl von Bezirken ermittelt.

Tabelle 7 und Abbildung 14 zeigen die Ergebnisse bei den GGT-Präparaten der Versuchsgruppe "A".

h nach HU	Tier	Leber- lappen	Anzahl der EAB	$\bar{x} \pm SD$
			$\frac{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}{\text{cm}^2}$	
0,0	1	LD	0,0	$0,4 \pm 0,9$
		PC	0,0	
	2	LD	2,2	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
1,5	1	LD	0,7	$2,5 \pm 2,9$
		PC	3,5	
	2	LD	7,7	
		PC	2,9	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
3,0	1	LD	0,0	$0,8 \pm 0,9$
		PC	0,0	
	2	LD	0,0	
		PC	2,3	
	3	LD	1,2	
		PC	1,4	

h nach HU	Tier	Leber- lappen	Anzahl der EAB	$\bar{x} \pm SD$
			cm^2 Schnittfläche	
4,5	1	LD	0,0	$0,9 \pm 2,1$
		PC	0,0	
	2	LD	0,0	
		PC	0,0	
	3	LD	5,2	
		PC	0,0	
6,0	1	LD	1,6	$0,5 \pm 0,7$
		PC	1,4	
	2	LD	0,0	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
7,5	1	LD	0,0	$0,0 \pm 0,0$
		PC	0,0	
	2	LD	0,0	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
9,0	1	LD	0,0	$0,7 \pm 0,7$
		PC	0,0	
	2	LD	0,7	
		PC	3,3	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
10,5	1	LD	8,1	$3,5 \pm 3,1$
		PC	0,0	
	2	LD	4,8	
		PC	5,5	
	3	LD	1,1	
		PC	1,5	
12,0	1	LD	0,0	$0,9 \pm 0,8$
		PC	1,8	
	2	LD	0,7	
		PC	0,0	
	3	LD	1,5	
		PC	1,4	

Tab. 7: Dichte der GGT⁺ Bezirke bei den Tieren der Versuchsgruppe A zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU.
s. Tab. 1.

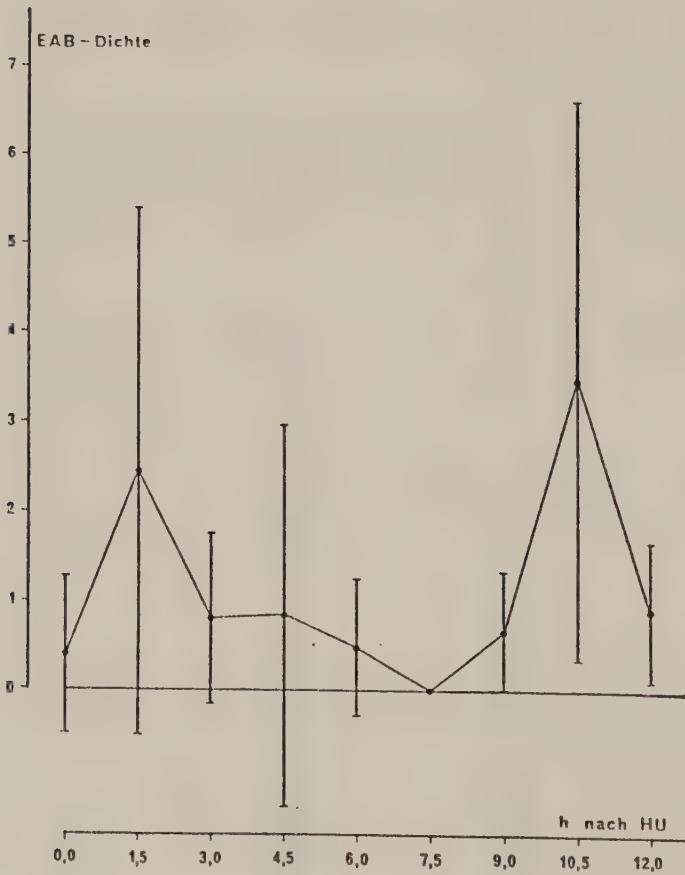


Abb. 14: Mittlere EAB-Dichte $\pm$ Standardabweichung bei den GGT-Präparaten der Gruppe A zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU.

$$\text{EAB-Dichte} = \frac{\text{Anzahl der EAB}}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$$

Mit Ausnahme des Zeitpunktes 3,0 h entspricht der Verlauf demjenigen des EAB-Anteils (siehe Abb. 12), bei wiederum starker Streuung der Einzelwerte um den jeweiligen Mittelwert. Die mittlere EAB-Dichte fällt von einem ersten Gipfel bei 1,5 h signifikant auf ein Minimum bei 7,5 h ab (zu diesem Zeitpunkt tritt kein einziger GGT⁺ Bezirk auf), um anschließend wieder anzusteigen bis zu einem absoluten Maximum bei 10,5 h (ebenfalls signifikant).

Um herauszufinden, ob dieser Abfall und Wiederanstieg auch bei anderen Enzymaberrationen beobachtet werden kann oder ob er spezifisch für GGT-positive Bezirke ist, wurden zum Vergleich ATPase-Schnitte untersucht (Tabelle 8, Abbildung 15).

Bei der Bewertung der Ergebnisse sind auch hier hohe Standardabweichungen zu berücksichtigen; der Kurvenverlauf ist aber eindeutig anders als bei den GGT-Präparaten. Die höchsten Werte finden sich 3,0 h nach HU; ein zweiter Gipfel tritt bei 6,0 h auf. Beim statistischen Vergleich benachbarter Zeitpunkte sind nur der Anstieg zwischen 1,5 h und 3,0 h sowie der Abfall zwischen 6,0 h und 7,5 h signifikant.

h nach HU	Tier	Leber- lappen	Anzahl der EAB	$\bar{x} \pm SD$
			cm ² Schnittfläche	
0,0	1	LD	0,0	$1,2$ $\pm 1,6$
		PC	0,0	
	2	LD	1,3	
		PC	4,1	
	3	LD	1,8	
		PC	0,0	
1,5	1	LD	0,0	$1,4$ $\pm 3,3$
		PC	0,0	
	2	LD	0,0	
		PC	8,2	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
3,0	1	LD	35,6	$11,9$ $\pm 14,3$
		PC	7,2	
	2	LD	23,3	
		PC	2,8	
	3	LD	2,6	
		PC	0,0	
4,5	1	LD	1,2	$4,8$ $\pm 4,8$
		PC	3,0	
	2	LD	5,9	
		PC	0,0	
	3	LD	13,6	
		PC	5,0	
6,0	1	LD	14,5	$9,7$ $\pm 4,6$
		PC	5,4	
	2	LD	14,6	
		PC	9,6	
	3	LD	10,5	
		PC	3,5	

h nach HU	Tier	Leber- lappen	Anzahl der EAB	$\bar{x} \pm SD$
			cm ² Schnittfläche	
7,5	1	LD	1,2	$2,8$ $\pm 2,2$
		PC	3,5	
	2	LD	4,9	
		PC	1,8	
	3	LD	5,6	
		PC	0,0	
9,0	1	LD	2,2	$2,4$ $\pm 2,1$
		PC	4,1	
	2	LD	5,1	
		PC	2,6	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
10,5	1	LD	12,7	$4,5$ $\pm 5,0$
		PC	1,7	
	2	LD	7,8	
		PC	5,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
12,0	1	LD	4,7	$5,6$ $\pm 4,9$
		PC	4,1	
	2	LD	10,0	
		PC	0,0	
	3	LD	12,8	
		PC	1,9	

Tab. 8: Dichte der ATPase⁻ Bezirke bei den Tieren der Versuchsgruppe A zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU.
s. Tab. 1.

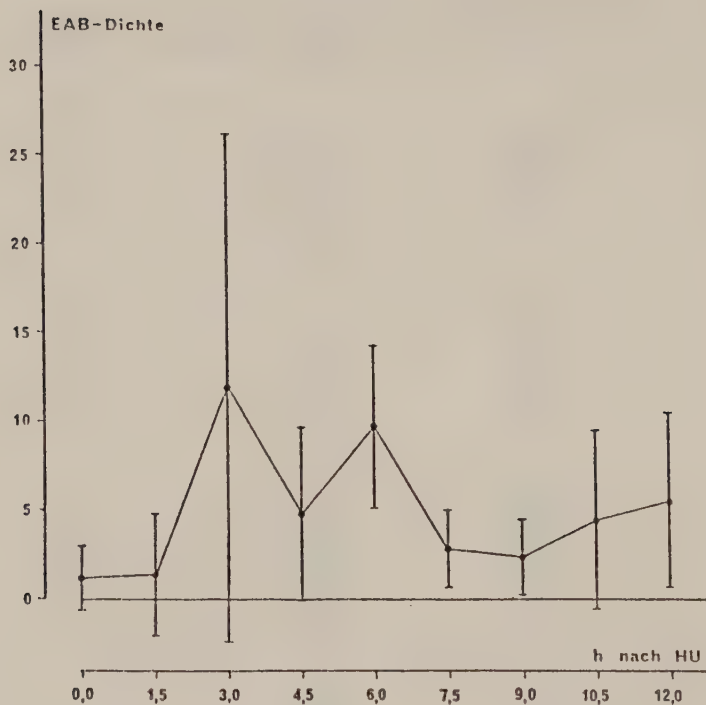


Abb. 15: Mittlere EAB-Dichte $\pm$ Standardabweichung bei den ATPase-Präparaten der Gruppe A zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU.

$$\text{EAB-Dichte} = \frac{\text{Anzahl der EAB}}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$$

In Tabelle 9 und Abbildung 16 sind die Ergebnisse bei den GGT-Präparaten der Versuchsgruppe "B" dargestellt.

h nach PH	Tier	Leber- lappen	Anzahl der EAB	$\bar{x} \pm SD$
			cm ² Schnittfläche	
12	1	LD	0,0	$0,0 \pm 0,0$
		PC	0,0	
	2	LD	0,0	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
24	1	LD	5,6	$1,1 \pm 2,2$
		PC	0,0	
	2	LD	0,8	
		PC	0,0	
	3	LD	0,0	
		PC	0,0	
48	1	LD	4,1	$7,8 \pm 3,5$
		PC	12,1	
	2	LD	4,8	
		PC	5,5	
	3	LD	9,1	
		PC	11,3	
72	1	LD	0,9	$1,2 \pm 1,2$
		PC	3,0	
	2	LD	1,7	
		PC	0,0	
	3	LD	1,6	
		PC	0,0	

Tab. 9: Dichte der GGT⁺ Bezirke bei den Tieren der Versuchsgruppe B zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH.
s. Tab. 1.

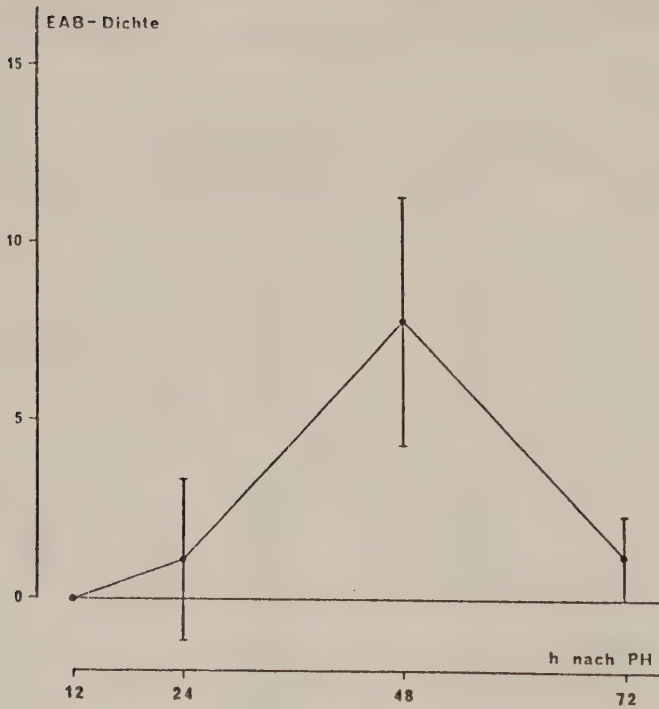


Abb. 16: Mittlere EAB-Dichte $\pm$ Standardabweichung bei den GGT-Präparaten der Gruppe B zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH.

$$\text{EAB-Dichte} = \frac{\text{Anzahl der EAB}}{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}$$

Wiederum ännelt der Verlauf der entsprechenden Kurve des EAB-Anteils (siehe Abb, 13): Von einem Minimum bei 12 h (hier findet sich kein einziger GGT⁺ Bezirk) steigt die EAB-Dichte bis zu einem Höchstwert bei 48 h an; im Anschluß daran fällt sie zum 72-h-Wert hin deutlich ab (signifikant im U-Test).

Bei der Versuchsgruppe "K" wurden sowohl GGT- als auch ATPase-Präparate untersucht (Tabellen 10 und 11).

Tier	Leber- lappen	Anzahl der EAB	$\bar{x} \pm SD$
		cm ² Schnittfläche	
1	LD	4,1	3,2 ± 2,1
	PC	7,1	
2	LD	3,0	
	PC	1,9	
3	LD	1,1	
	PC	2,1	

Tab. 10: Dichte der GGT⁺ Bezirke bei den Tieren der Versuchsgruppe K.
s. Tab. 1.

Tier	Leber- lappen	Anzahl der EAB	$\bar{x} \pm SD$
		$\frac{\text{cm}^2 \text{ Schnittfläche}}{\text{cm}^2}$	
1	LD	25,8	9,4 $\pm 8,6$
	PC	11,9	
2	LD	5,5	
	PC	2,2	
3	LD	5,6	
	PC	5,4	

Tab. 11: Dichte der ATPase⁻ Bezirke bei den Tieren der Versuchsgruppe K.
s. Tab. 1.

Vergleicht man die hier ermittelten EAB-Dichten mit den jeweils entsprechenden Ergebnissen der Gruppe "A", so findet man sie etwas unterhalb von deren Maximalwerten gelegen. Im Vergleich mit der Gruppe "B" liegt der Kontrollwert deutlich unter deren Maximalwert, allerdings auch klar über den nächstfolgenden Werten.

Bei der Ergebnisbewertung sind auch hier die hohen Standardabweichungen zu berücksichtigen; in keinem Fall treten statistisch signifikante Unterschiede auf.

4. Veränderungen des Körpergewichts DÄNA-behandelter Tiere im Vergleich zu unbehandelten Kontrollratten

In einem Zusatzversuch wurde in wöchentlichen Abständen das Gewicht von nicht mit DÄNA behandelten Ratten (DÄNA⁻-Tiere) mit dem Gewicht der DÄNA-behandelten Ratten der Versuchsgruppen A, B und K (DÄNA⁺-Tiere) verglichen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 und Abbildung 17 dargestellt.

Das Gewicht der DÄNA⁻-Tiere liegt durchgehend über dem der DÄNA⁺-Tiere; signifikante Unterschiede ergeben sich 1, 11, 12 und 14 Wochen nach Versuchsbeginn.

Woche nach Versuchs- beginn	Gewicht der DÄNA ⁺ -Tiere $\bar{x}$ (g) $\pm$ SD	Gewicht der DÄNA ⁻ -Tiere $\bar{x}$ (g) $\pm$ SD
Ausgangs- gewicht	103,0 $\pm$ 3,0	106,5 $\pm$ 3,4
1	127,4 $\pm$ 6,8	136,1 $\pm$ 6,3
2	156,2 $\pm$ 8,7	157,0 $\pm$ 6,7
3	186,1 $\pm$ 10,6	187,2 $\pm$ 11,0
4	206,5 $\pm$ 9,7	213,8 $\pm$ 10,1
5	223,8 $\pm$ 12,5	229,3 $\pm$ 17,0
6	239,2 $\pm$ 14,5	243,5 $\pm$ 14,5
7	254,7 $\pm$ 17,6	260,5 $\pm$ 15,7
8	260,0 $\pm$ 20,0	272,8 $\pm$ 15,8
9	265,8 $\pm$ 23,8	285,0 $\pm$ 14,7
10	271,8 $\pm$ 22,1	289,8 $\pm$ 22,0
11	271,5 $\pm$ 28,0	297,7 $\pm$ 19,9
12	277,8 $\pm$ 30,1	302,8 $\pm$ 21,1
13	285,8 $\pm$ 25,5	309,0 $\pm$ 21,7
14	293,3 $\pm$ 25,8	313,3 $\pm$ 20,4
15	296,0 $\pm$ 24,4	314,8 $\pm$ 19,2
16	299,1 $\pm$ 20,2	318,2 $\pm$ 20,4
17	303,3 $\pm$ 27,4	321,5 $\pm$ 18,5

Tab. 12: Mittleres Gewicht von DÄNA⁺- und DÄNA⁻-Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn.

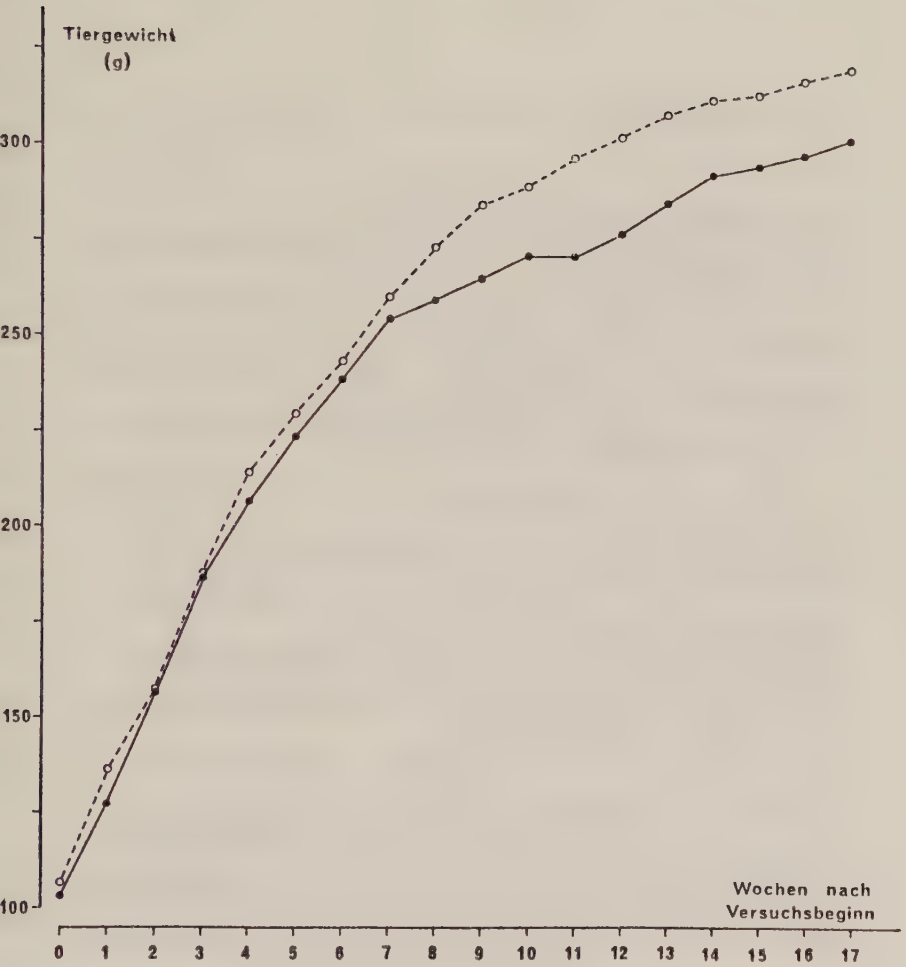


Abb. 17: Mittleres Tiergewicht zu verschiedenen Zeitpunkten nach Versuchsbeginn.

● — ● DANA⁺-Tiere

○ - - - ○ DANA⁻-Tiere

D. DISKUSSION

Im proliferationskinetischen Teil der vorliegenden Arbeit wurde die Reaktion enzymaberranter (präneoplastischer) und normaler Hepatozyten auf einen Wachstumsreiz wie die partielle Hepatektomie mit Hilfe des Parameters ^3H -Thymidin-Markierungsindex untersucht. Durch Vergleich der beiden Zellpopulationen sollte eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die präneoplastischen Zellen 3 Monate nach 4wöchiger Carcinogengabe ($20 \times 8 \text{ mg/kg KG/die}$) noch in die Wachstumsregulation des gesamten Zellverbundes eingegliedert sind bzw. inwieweit sie im Laufe ihrer Entwicklung schon eine gewisse Autonomie erworben haben.

Die Leber der nicht teilhepatektomierten Kontrolltiere zeigt nur eine sehr geringe Proliferation. Im Normalgewebe finden sich durchschnittlich 0,1 % der Hepatozyten markiert, was den Ergebnissen anderer Autoren entspricht (z.B. 0,1 % bei Rabes, 1969).

Der durchschnittliche Markierungsindex der GGT^+ Bezirke lag mit 0,3 % geringfügig über diesem Niveau. Dieser Unterschied kann statistisch jedoch nicht gesichert werden, da die meisten EAB keine einzige markierte Zelle aufweisen und sich nur in zwei Bezirken jeweils eine

markierte Zelle findet. Eine bei Rabes et al. (1972b) beschriebene große Heterogenität im Wachstumsverhalten der EAB, in denen, allerdings in späteren Entwicklungsstadien, teilweise hohe Proliferationsraten auftraten, wird hier ebensowenig beobachtet wie eine generell erhöhte Proliferation in präneoplastischen Bezirken (Barbason und Betz, 1981). Als mögliche Ursache kommt die mit 20 Tagen verhältnismäßig kurze Carcinogenapplikation in Betracht.

Im Normalgewebe der HU-synchronisierten regenerierenden Leber finden sich direkt nach Absetzen des Zytostatikums so gut wie keine markierten Zellen. Die Hepatozyten, die während der 10stündigen Infusion die G_1 -Phase durchlaufen haben, sind also vollständig am Eintritt in das S-Kompartiment gehindert worden.

Der nun folgende rasche Anstieg des Markierungsindex signalisiert ebenso wie der anschließende steile Abfall eine effektive Synchronisation der Hepatozyten (Rabes et al., 1977, 1986). Der zeitliche Ablauf mit einem Maximalwert bei 4,5 h, anschließendem Rückgang auf niedrigere Werte und erneutem leichtem Anstieg zwischen 9,0 h und 10,5 h entspricht in etwa den Ergebnissen bei Ratten, die kein Carcinogen erhalten hatten (Rabes et al., 1986), wenngleich dort ein Wiederanstieg nicht beobachtet wurde.

Ursache für diesen zweiten Gipfel könnte eine Proliferationswelle von Zellen sein, die erst spät - 34,5 h nach PH - aus der G_1 - in die S-Phase übertreten. Dies ist denkbar, da Hepatozyten, die im zentralen Fünftel des Leberlobulus gelegen sind, 34 - 40 Stunden für das Durchlaufen der postoperativen G_1 -Phase benötigen (Rabes und Tuczek, 1970).

Hingegen kann ein erneutes Eintreten von Hepatozyten in eine zweite S-Phase zu diesem Zeitpunkt ausgeschlossen werden, da die mittlere Zellzyklusdauer nach einer Zweidrittel-Hepatektomie 33 Stunden beträgt (Rabes et al., 1972a; Rabes, 1976), und diese Zeitspanne durch die nach HU-Applikation auftretende S-Phasenverkürzung (Sinclair, 1967; Pfeiffer und Tolmach, 1967; Rabes et al., 1977) nur unwesentlich verkleinert wird.

Nicht-parenchymale Leberzellen, die deutlich später als die Hepatozyten in das S-Kompartiment eintreten (Rabes et al., 1977) und 10 h nach HU zu einer erhöhten spezifischen Aktivität von 3H -markierter DNA führen (Schuster et al., 1985; Rabes, 1986), scheiden als Ursache ebenfalls aus, da zur Auswertung nur Hepatozyten herangezogen wurden.

Soweit beurteilbar (fehlender Wert bei 7,5 h), findet sich in den GGT⁺ Bezirken nahezu derselbe zeitliche Ablauf der Proliferation wie im Normalgewebe. Auch hier

nimmt der mittlere Markierungsindex bis zu einem Maximalwert bei 4,5 h kontinuierlich zu, fällt danach deutlich ab und erreicht einen zweiten Gipfel bei 10,5 h. Offensichtlich können die enzymaberranten Zellen im Durchschnitt noch genauso auf den Wachstumsreiz der PH reagieren wie normale Hepatozyten, was auf ein frühes Stadium der Präneoplasie hinweist (Rabes et al., 1970b; Rabes, 1979).

Bei der Betrachtung der einzelnen Zeitpunkte fallen zwei Befunde auf:

- 1) Die durchgehend höheren mittleren Markierungsindices der GGT⁺ Foci weisen auf eine stärkere Proliferation und damit auf einen Wachstumsvorteil der präneoplastischen Zellen hin, auch wenn signifikante Unterschiede zu den Vergleichswerten der Normalleber nur zu den Zeitpunkten 1,5 h, 9,0 h und 10,5 h bestehen.
- 2) Bis zum Zeitpunkt 7,5 h, und damit während der gesamten S-Phase, liegen die Markierungsindices sowohl der GGT⁺ Foci als auch des Normalgewebes deutlich unter vergleichbaren Werten bei Ratten, die ebenfalls teilhepatektomiert und 10 h mit HU infundiert wurden, zuvor aber kein Carcinogen erhalten hatten (Rabes et al., 1986). So ermittelten diese Untersucher beispielsweise einen maximalen Markierungsindex von fast 50 %, während die eigenen Auswertungen nur Höchstwerte von 38,1 % (EAB)

bzw. 34,8 % (Normalgewebe) ergaben.

Abgesehen von der DÄNA-Applikation, unterscheiden sich die Versuche nur im Zeitpunkt der Teilhepatektomie (Rabes und Mitarbeiter führten die Operationen abends zwischen 19.00 und 21.00 Uhr durch) und im Tiergewicht (Rabes et al. (1986) verwendeten 200 - 220 g schwere Tiere; die Ratten der eigenen Versuche wogen zum Zeitpunkt der PH durchschnittlich 303 g).

Der unterschiedliche Operationszeitpunkt scheidet als Ursache für die erniedrigten Proliferationsraten aus; eine morgendliche Teilhepatektomie, wie sie hier durchgeführt wurde, löst gegenüber einer abendlichen sogar eine verstärkte Regeneration aus (Jaffe, 1954; Klinge und Mathyl, 1969).

Zum Teil könnten die erniedrigten Markierungsindices auf die Unterschiede in Alter und Körpergewicht zurückzuführen sein, wenngleich sich in der Literatur hierzu widersprüchliche Angaben finden. Während Bucher et al. (1964) auch jenseits des Säuglingsalters noch eine Abnahme der Proliferationsraten mit steigendem Alter der Ratten beobachteten, ergaben Untersuchungen von Peters (1962), daß die Mitosehäufigkeit ab einem Körpergewicht von 160 g nahezu konstant bleibt. Allein können jedoch mögliche Einflüsse von Alter bzw. Körpergewicht auf die Proliferation die erheblich voneinander abweichenden

Markierungsindices nicht erklären.

Es wird daher vermutet, daß die vorausgegangene Carcinogenexposition für die erniedrigten Proliferationsraten verantwortlich ist.

Es ist bekannt, daß DÄNA die DNA-Synthese in Hepatozyten hemmt (Rabes et al., 1970a; Slaga et al., 1973; Craddock, 1975). Die Beobachtung, daß enzymaberrante Zellen Carcinogene in geringerem Maße metabolisieren und gleichzeitig weniger durch sie geschädigt werden als normale Zellen, läßt Farber et al. (1976b) zu dem Schluß gelangen, daß der Proliferationsvorteil präneoplastisch veränderter Hepatozyten auf ihre erhöhte Resistenz gegen die toxische Wirkung eines Carcinogens zurückzuführen ist.

Diese Theorie könnte die in GGT⁺ Foci und Normalgewebe unterschiedlich stark erniedrigten Markierungsindices bei Carcinogen-Dauerexposition erklären. Sie erscheint hier aber nicht stichhaltig, da in den geschilderten Versuchen zwischen der letzten DÄNA-Applikation und der PH ein carcinogenfreies Intervall von 91 Tagen lag. Eine Aktivierung autokriner Wachstumsfaktoren in initiierten Zellen (Sporn und Todaro, 1980; Luetkeke und Michalopoulos, 1985) würde zu erhöhten Markierungsindices in den EAB führen und kommt daher nicht in Betracht.

Barbason und Mitarbeiter (Barbason und Betz, 1981; Barbason et al., 1983) gehen davon aus, daß initiierte Zellen mit verkürzten Zellzykluszeiten, wie sie von Rabes und Szymkowiak (1979) vor allem in späten Stadien der Präneoplasie gefunden wurden, durch eine Störung der homöostatischen Proliferationskontrolle einen Wachstumsvorteil erhalten. In der Leber nicht teilhepatektomierter Ratten mußten demnach die Zellen in den GGT⁺ Bezirken stärker proliferieren als im umgebenden Normalgewebe; dieser Unterschied war jedoch in der vorliegenden Untersuchung nicht signifikant. Auch die durch die Carcinogenexposition erniedrigten Proliferationsraten nach PH werden durch diese Theorie nicht erklärt.

Es ist folglich zu überlegen, ob DÄNA eine Wachstumshemmung induziert, die auch 3 Monate nach Absetzen des Carcinogens noch anhält, und von der normale Hepatozyten stärker betroffen sind als präneoplastische. Ein Nachweis dieser Wirkung wäre, zumindest in dem hier noch frühen Stadium der Präneoplasie, erst nach einem Wachstumsreiz wie der PH möglich.

Für eine solche Überlegung spricht die Beobachtung, daß auch nach Beendigung der 4wöchigen DÄNA-Applikation die Tiere aller 3 Versuchsgruppen im Mittel stets weniger wogen als die Ratten einer Vergleichsgruppe, die kein

Carcinogen erhalten hatten (Zusatzversuch). Offensichtlich macht sich die persistierende Wachstumshemmung nach der DÄNA-Applikation auch im geringeren Tiergewicht bemerkbar.

Die Scatter-Diagramme, in denen die Markierungsindices der einzelnen GGT⁺ Foci deren Größe zugeordnet sind, lassen einen Zusammenhang zwischen diesen Parametern nicht erkennen. Es fällt vielmehr eine große Streuung der Einzelwerte auf.

Bei den kleinen Aberrationsbezirken sind große Fehlerbreiten zu berücksichtigen; schon eine einzige markierte Zelle führt zu einer deutlichen Veränderung des Markierungsindex. Die Streuung ist daher zumindest teilweise als zufallsbedingt anzusehen.

Bei größeren EAB spielen solche Überlegungen eine untergeordnete Rolle. Die auch hier beobachteten erheblichen Unterschiede im Wachstumsverhalten werden besonders deutlich am Beispiel der zwei größten Bezirke (1125 bzw. 728 Zellen; beide waren 3,0 h nach HU nachweisbar). Der eine zeigt mit 8,9 % einen wesentlich niedrigeren Markierungsindex als das umgebende Normalgewebe (20,9 %). Er reagiert offensichtlich nur noch in geringem Maße auf den Wachstumsreiz der PH, was eine zunehmend autonome Proliferation signalisiert (Rabes et al., 1970b). Der andere EAB weist 44,1 % markierte Zellen

auf und spricht damit sehr stark auf die PH an. Aus dieser Streuung wird eine große Heterogenität der EAB in ihrem Wachstumsverhalten ersichtlich, wie sie bereits mehrfach beschrieben wurde (Rabes et al., 1972b; Kitagawa, 1976; Rabes und Szymkowiak, 1979). Einschränkend muß aber darauf hingewiesen werden, daß auch die Normalleber tierindividuelle Unterschiede der Proliferationsraten aufweist. Die bei den EAB beobachtete Heterogenität muß daher teilweise auf die biologische Verschiedenheit der Versuchstiere zurückgeführt werden.

In der Normalleber der mit ^3H -TdR dauerinfundierten Ratten wurden 12 h nach PH nur vereinzelt markierte Zellen gefunden, entsprechend der in nicht teilhepatektomierten Tieren ermittelten Grundproliferation. Dies erklärt sich aus der Tatsache, daß die ersten Hepatozyten etwa 15 h nach PH in die S-Phase eintreten (Rabes und Brändle, 1969).

Zum Zeitpunkt 12 h wurde in den untersuchten Schnitten kein einziger GGT^+ Bezirk gefunden, so daß hier ein Vergleich mit dem Normalgewebe nicht möglich ist.

In der Folge zeigt sich in GGT^+ Foci und Normalgewebe ein ähnlicher zeitlicher Ablauf der Proliferation: Bis 48 h nimmt der Markierungsindex rasch zu; danach fällt der Anstieg deutlich geringer aus. Dies bestätigt die schon bei der Versuchsgruppe "A" (^3H -TdR-Pulsmarkie-

rung) gemachte Beobachtung, wonach die präneoplastischen Zellen im Durchschnitt genauso auf die Teilhepatektomie reagieren wie normale Hepatozyten.

48 h nach PH hat die gesamte Wachstumsfraktion die S-Phase einmal durchlaufen (Rabes und Tuczek, 1970; Rabes, 1976). Sie ist mit 74,1 % in den EAB signifikant höher als im Normalgewebe (62,5 %). Vergleichbare Werte und einen ähnlich großen Unterschied beobachteten Rabes und Szymkowiak (1979) in der Leber von Ratten, die direkt im Anschluß an eine 60tägige ununterbrochene DÄNA-Fütterung teilhepatektomiert worden waren. Bezieht man nun noch die mit über 90 % erheblich höheren Wachstumsfraktionen bei ebenfalls teilhepatektomierten, aber nicht mit Carcinogen behandelten Tieren (Stöcker, 1966; Rabes et al., 1970b; Rabes und Szymkowiak, 1979) in die Überlegungen mit ein, so liegt, wie schon bei der Versuchsgruppe "A", der Schluß auf eine DÄNA-induzierte wachstumshemmende Wirkung nahe, die auch nach einem langen carcinogenfreien Intervall noch anhält. Wiederum scheint ein Wachstumsvorteil der präneoplastischen Zellen zu bestehen, da auch zu den anderen beurteilbaren Zeitpunkten (24 h und 72 h) in den GGT⁺ Foci höhere Proliferationsraten gefunden werden als im Normalgewebe. Der Unterschied ist hier allerdings nicht signifikant.

Radiotoxische Wirkungen des dauerinfundierten ^3H -TdR können nicht für die niedrigen Wachstumsfraktionen verantwortlich gemacht werden. Eine von verschiedenen Autoren (Grisham, 1960; Post und Hoffman, 1965, 1967) beschriebene Hemmung der Leberregeneration durch radioaktiv markiertes Thymidin kann sich nicht auf den Markierungsindex auswirken, da radiotoxisch geschädigte Zellen in jedem Fall markiert sind, andererseits aber morphologisch lange erhalten bleiben.

Der zwischen 48 h und 72 h beobachtete weitere Anstieg des MI ist wohl nicht auf neue in die S-Phase eintretende Zellen zurückzuführen. Bereits markierte Zellen, die in diesem Zeitintervall eine Mitose durchlaufen haben und nun doppelt erfaßt werden, dürften hierfür verantwortlich sein.

Faßt man die Ergebnisse der beiden Versuchsgruppen zusammen, so kann folgendes festgestellt werden:

- 1) Insgesamt gesehen, sprechen die präneoplastischen Zellen genauso auf den Wachstumsreiz einer partiellen Hepatektomie an wie normale Hepatozyten. Wenige GGT⁺ Bezirke machen hier eine Ausnahme. Ein autonomes Wachstum ist damit 3 Monate nach einer 20tägigen Carcinogenapplikation noch nicht zu erkennen, was auf ein frühes Sta-

dium der Präneoplasie hinweist (Rabes et al., 1970b; Rabes, 1979).

2) In Anbetracht der gegenüber nicht mit Carcinogen behandelten Tieren deutlich erniedrigten Proliferationsraten wird vermutet, daß DÄNA eine Wachstumshemmung induziert, die normale Zellen offensichtlich stärker betrifft als präneoplastische. Da diese Wirkung auch nach einem langen carcinogenfreien Intervall noch anhält, kann sie nicht auf die akute Toxizität des Carcinogens zurückgeführt werden.

Enzymaberrante Bezirke entstehen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch klonales Wachstum aus einer einzigen Zelle (Rabes et al., 1982a). Innerhalb der relativ kurzen Zeit von 4 Monaten zwischen der ersten DÄNA-Injektion und der enzymhistochemischen Untersuchung erreichen sie in den geschilderten Versuchen zum Teil beträchtliche Größen, was auf eine gegenüber dem Normalgewebe gesteigerte Proliferation hinweist.

In der hier vorgefundenen Frühphase der Präneoplasie könnte folglich die Wachstumsaberration darin bestehen, daß die initiierten Zellen bereits ein endogenes Wachstumspotential besitzen, andererseits aber nach einem Proliferationsstimulus wie der PH noch in die Wachstumsregulation im gesamten Zellverbund eingegliedert sind.

Ein allmählicher Verlust dieser Wachstumskoordination in späteren Stadien der Präneoplasie könnte den Übergang in die Malignität darstellen.

Es soll bei der Interpretation der Ergebnisse aber nicht übersehen werden, daß pro Versuchszeitpunkt nur 3 Ratten zur Verfügung standen. Da die ermittelten Werte von Tier zu Tier mitunter große Schwankungen aufweisen, ist diese Zahl möglicherweise zu gering, um statistisch zuverlässige Aussagen machen zu können.

Ein weiterer Punkt könnte von Bedeutung sein: Wenngleich durch die Erstellung gewichteter Mittelwerte der unterschiedlichen Größe der GGT⁺ Foci Rechnung getragen wurde, so bleibt doch die von Zeitpunkt zu Zeitpunkt sehr unterschiedliche Anzahl der EAB, die jeweils für die Berechnung des durchschnittlichen MI zur Verfügung standen, als Fehlerquelle bestehen. Besonders deutlich wird dies bei der Versuchsgruppe "A": Zu den Zeitpunkten 0,0 h, 4,5 h, 6,0 h und 9,0 h weist nur jeweils eines von 3 Tieren GGT⁺ Bezirke auf; demgegenüber konnten 10,5 h und 12,0 h nach HU alle Tiere in die Auswertung einbezogen werden.

In einer Zusatzauswertung wurden in jedem Präparat die einzeln gelegenen markierten und unmarkierten GGT-positiven Hepatozyten gezählt. Sie treten in sehr unter-

schiedlicher Anzahl und insgesamt selten auf. Weder die Verteilung der Zellen noch ihre Proliferationsaktivität lassen eine Gesetzmäßigkeit erkennen.

Schulte-Hermann et al. (1981) beobachteten, daß eine für präneoplastische Bezirke typische Proliferationssteigerung nach Gabe von Promotoren (z.B. Phenobarbital) in einzeln gelegenen GGT-positiven Hepatozyten ausblieb. Die Bedeutung dieser Zellen für die Hepatocarcinogenese ist daher zumindest fraglich.

Es soll nicht unerwähnt bleiben, daß bei verschiedenen Rattenstämmen die Bedeutung der GGT als präneoplastisches Markerenzym an sich zweifelhaft erscheint.

So konnten Bone III et al. (1985) nachweisen, daß bei weiblichen Fischer 344-Ratten GGT⁺ Bezirke allein durch eine PH induziert werden können.

Ferner wurde in Donryu-Ratten (Kitagawa et al., 1980) sowie in Fischer 344- und Sprague-Dawley-Ratten (Russell et al., 1987) das inkonstante und von der Zusammensetzung des Futters abhängige Auftreten von nicht-fokaler GGT beobachtet. Sie findet sich in der gesamten Leber, besonders in periportalen Hepatozyten (Russell et al., 1987), und kann immunhistochemisch von fokaler GGT differenziert werden (Fischer et al., 1986).

An den bei den eigenen Experimenten verwendeten Wistar AF/Han-Ratten konnten die genannten Beobachtungen bis-

her nicht gemacht werden; die GGT erscheint daher bei diesem Tierstamm als geeigneter Marker für präneoplastische Zellpopulationen.

Bei der Bestimmung der Markierungsindices in der HU-synchronisierten Leber war aufgefallen, daß die histologischen Präparate zu den frühen und späten Zeitpunkten im Durchschnitt mehr GGT⁺ Bezirke aufwiesen als zu den mittleren. Um diese Beobachtungen quantifizieren zu können, wurden zu jedem Zeitpunkt Flächenanteil und Dichte der EAB bestimmt; Bezugswert war dabei die Schnittfläche der Präparate.

Der Flächenanteil der GGT⁺ Bezirke steigt zunächst bis zu einem Maximum bei 3,0 h an, fällt dann kontinuierlich ab bis zu einem Minimum bei 7,5 h (hier findet sich kein einziger GGT⁺ Bezirk) und erreicht einen zweiten Gipfel bei 10,5 h.

Der Maximalwert bei 3,0 h tritt wohl zufällig zu diesem Zeitpunkt auf. Die hier gefundene Gesamtfläche setzt sich im wesentlichen aus zwei sehr großen EAB zusammen; die anderen Bezirke sind erheblich kleiner.

Auch zu den anderen Zeitpunkten zeigt sich eine starke Streuung der Einzelwerte. Die in keinem Fall signifikanten Unterschiede müssen daher vor allem als zufallsbedingt angesehen werden. Eine Gesetzmäßigkeit, die in ei-

nem Rückgang des EAB-Anteils bis 7,5 h und einem anschließenden Wiederanstieg bestehen könnte, kann hier bestenfalls vermutet werden.

Deutlicher zum Ausdruck kommt ein solches Verhalten bei der EAB-Dichte. Sie fällt von einem ersten Gipfel bei 1,5 h signifikant ab bis zu einem Minimum bei 7,5 h und steigt dann, ebenfalls signifikant, wieder an bis zu einem Maximum bei 10,5 h.

Gegen eine phänotypische Reversibilität, wie sie Farber und Mitarbeiter (Farber, 1980; Enomoto und Farber, 1982; Farber, 1984) bei über 90 % der präneoplastischen Leberzellpopulationen fanden, spricht außer den von den eigenen Experimenten erheblich differierenden Versuchsbedingungen (Solt-Farber-Modell der Hepatocarcinogenese; Solt und Farber, 1976) die Tatsache, daß die von den genannten Autoren beobachtete phänotypische Rückbildung persistierte, während die GGT⁺ Foci in den hier geschilderten Experimenten ab dem Zeitpunkt 9,0 h nach HU wieder nachweisbar werden.

Denkbar hingegen ist, daß das Markerenzym GGT auf dem Wege über eine erniedrigte mRNA-Transskription während der verkürzten DNA-Replikation nach HU (Sinclair, 1967; Pfeiffer und Tolmach, 1967; Rabes et al., 1977) in ge-

ringerem Maße produziert wird als in anderen Phasen des Zellzyklus. Auf diese Weise könnten während der S-Phase einige GGT⁺ Bezirke dem Nachweis entgehen, vor allem solche mit nur geringer Expression des Enzyms. Zu dieser Überlegung paßt, daß bei den nicht teilhepatektomierten Kontrolltieren der Gruppe "K" eine vergleichsweise hohe EAB-Dichte gefunden wurde; sie unterscheidet sich signifikant von den Werten zu den Zeitpunkten 6,0 h bis 9,0 h nach HU. Lediglich der niedrige Wert direkt nach Absetzen der HU-Infusion spricht gegen diese Theorie, da zu diesem Zeitpunkt noch keine DNA-Synthese stattfindet.

Die Kenntnis der biologischen Halbwertszeiten der mRNA für GGT sowie des Enzyms selbst könnte weiteren Aufschluß darüber geben, ob der beobachtete Rückgang und Wiederanstieg der EAB-Dichte tatsächlich auf eine zellzyklusabhängige Expression der GGT zurückzuführen ist; kurze Halbwertszeiten wären dafür Voraussetzung. In der Literatur wurden hierzu keine Angaben gefunden.

Um herauszufinden, ob dieses auffällige Verhalten auch bei anderen Enzymaberrationen auftritt oder ob es spezifisch für GGT⁺ Bezirke ist, wurde die EAB-Dichte zum Vergleich auch in den ATPase-Präparaten bestimmt.

Hier zeigt sich nun ein eindeutig anderer Verlauf. Die höchsten Werte finden sich zwischen 3,0 h und 6,0 h; so-

wohl der Anstieg zwischen 1,5 h und 3,0 h als auch der Abfall zwischen 6,0 h und 7,5 h sind signifikant. Im Gegensatz zu den GGT-Präparaten erscheint hier also die EAB-Dichte während der S-Phase erhöht. Eine vergleichsweise hohe Dichte ATPase⁻ Bezirke tritt auch bei den nicht teilhepatektomierten Tieren der Gruppe "K" auf. Der statistische Vergleich im U-Test ergibt aber zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied.

Anders als die GGT ist die ATPase ein "negativer" Marker, d.h. ATPase-Defektbezirke haben einen gegenüber dem Normalgewebe verminderten Enzymgehalt. Sie stellen dabei keine homogene Gruppe dar; vielmehr gibt es Bezirke mit geringerer und solche mit stärkerer Reduktion der Enzymaktivität (Fischer et al., 1982). Das vermehrte Auftreten von ATPase⁻ Bezirken während der S-Phase könnte daher folgendermaßen erklärt werden: Denkbar sind präneoplastische Bezirke, deren ATPase-Mangel so gering ist, daß sie normalerweise dem Nachweis entgehen. Eine während der DNA-Replikation verminderte Enzymsynthese könnte solche Bezirke nachweisbar machen, wodurch ihre Gesamtzahl scheinbar ansteigen würde. Die bei den GGT-Präparaten aufgestellte Hypothese, wonach die Expression von Markerenzymen von der jeweiligen Zellzyklusphase abhängt, würde dadurch unterstützt.

Sollte die Theorie einer zellzyklusabhängigen Expression der GGT und der ATPase zutreffen, so könnte diese Instabilität der Markerenzyme ihre Aussagekraft für quantitative enzymhistochemische Untersuchungen in Frage stellen.

Einschränkend muß darauf hingewiesen werden, daß pro Versuchszeitpunkt nur 3 Tiere zur Verfügung standen. In Anbetracht der durchwegs stark streuenden Einzelwerte dürfte diese Zahl für eine zuverlässige Aussage noch nicht ausreichen.

Bei den ebenfalls teilhepatektomierten, aber nicht mit HU infundierten Tieren der Gruppe "B" zeigen Flächenanteil und Dichte der GGT⁺ Foci einen annähernd gleichen Verlauf. Sowohl der deutliche Anstieg zwischen 12 h und 48 h als auch der folgende Rückgang der Werte ist bei beiden Parametern zu beobachten. Eine Gesetzmäßigkeit läßt sich dabei nicht erkennen. Die zum Teil auftretenden Signifikanzen (signifikanter Anstieg zwischen 24 h und 48 h beim EAB-Anteil; signifikanter Anstieg zwischen 12 h und 48 h sowie signifikanter Abfall zwischen 48 h und 72 h bei der EAB-Dichte) sollten nicht überbewertet werden, da die zwischen den Versuchszeitpunkten liegenden Intervalle sehr groß sind und daher eine exakte Verlaufsbeurteilung nicht zulassen. Unter diesen Ge-

sichtspunkten könnten die auftretenden Unterschiede als zufallsbedingt angesehen werden.

E. VERGLEICH MIT ERGEBNISSEN BEI PHENOBARBITALBEHANDEL- TEN TIEREN (PARALLELARBEIT VON H. WAGNER)

Parallel zu den Experimenten der vorliegenden Arbeit führte H. Wagner (1987) im Rahmen seiner Dissertation Versuche an Ratten durch, die während der 9ltägigen Latenzperiode zwischen der letzten DÄNA-Applikation und der PH kontinuierlich mit phenobarbitalhaltiger Diät gefüttert wurden (Altromin 1324 Sondermischung mit 0,05 % Phenobarbital-Na; Altromin Spezialfutterwerke, Lage, Lippe). Versuchsaufbau und -durchführung waren in beiden Experimenten identisch; ein Vergleich der Ergebnisse ist daher ohne Einschränkung möglich.

Die Übernahme der Zahlenwerte aus Wagner (1987) erfolgt im Einverständnis mit dem Autor.

Tabelle 13 (³H-TdR-Pulsmarkierung nach HU-Block) und Tabelle 14 (³H-TdR-Dauermarkierung direkt im Anschluß an die PH) zeigen die durchschnittlichen Markierungsindizes in GGT⁺ Foci und Normalgewebe bei den phenobarbital-behandelten Tieren. In den Abbildungen 18 - 21 sind sie den entsprechenden Ergebnissen der eigenen Versuche gegenübergestellt.

Zur Vereinfachung des Vergleichs werden folgende Abkür-

zungen verwendet:

PB⁺-Tiere: Tiere, die phenobarbitalhaltige Diät erhielten

PB⁻-Tiere: Tiere, die mit Standard-Diät ohne Phenobarbitalbeimischung gefüttert wurden.

h nach	MI Normalgewebe	MI GGT ⁺ Bezirke
HU	$\bar{x} (\%) \pm SD$	$\bar{x} (\%) \pm SD$
0,0	3,6 $\pm$ 1,3	9,9 $\pm$ 1,5
1,5	14,8 $\pm$ 6,2	25,8 $\pm$ 7,4
3,0	32,4 $\pm$ 11,3	32,0 $\pm$ 9,0
4,5	39,6 $\pm$ 4,5	42,0 $\pm$ 4,8
6,0	37,1 $\pm$ 8,2	34,6 $\pm$ 4,8
7,5	22,9 $\pm$ 3,4	24,0 $\pm$ 5,8
9,0	14,5 $\pm$ 4,6	22,0 $\pm$ 9,6
10,5	21,5 $\pm$ 3,8	22,7 $\pm$ 3,9
12,0	25,1 $\pm$ 5,9	27,3 $\pm$ 7,5
Basale Proliferation	0,3 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,3

Tab. 13: Mittlerer Markierungsindex von GGT⁺ Bezirken und Normalgewebe bei phenobarbitalbehandelten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU, sowie basale Proliferation (³H-TdR-Pulsmarkierung; Werte aus Wagner, 1987).

h nach	MI Normalgewebe	MI GGT ⁺ Bezirke
HU	$\bar{x} (\%) \pm SD$	$\bar{x} (\%) \pm SD$
12	0,2 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ n.b.
24	11,8 $\pm$ 7,8	14,0 $\pm$ 15,6
48	57,1 $\pm$ 3,3	67,1 $\pm$ 3,0
72	70,9 $\pm$ 9,2	72,8 $\pm$ 9,8

Tab. 14: Mittlerer Markierungsindex von GGT⁺ Bezirken und Normalgewebe bei phenobarbitalbehandelten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH (³H-TdR-Dauermarkierung; Werte aus Wagner, 1987).
n.b. = nicht bestimmbar

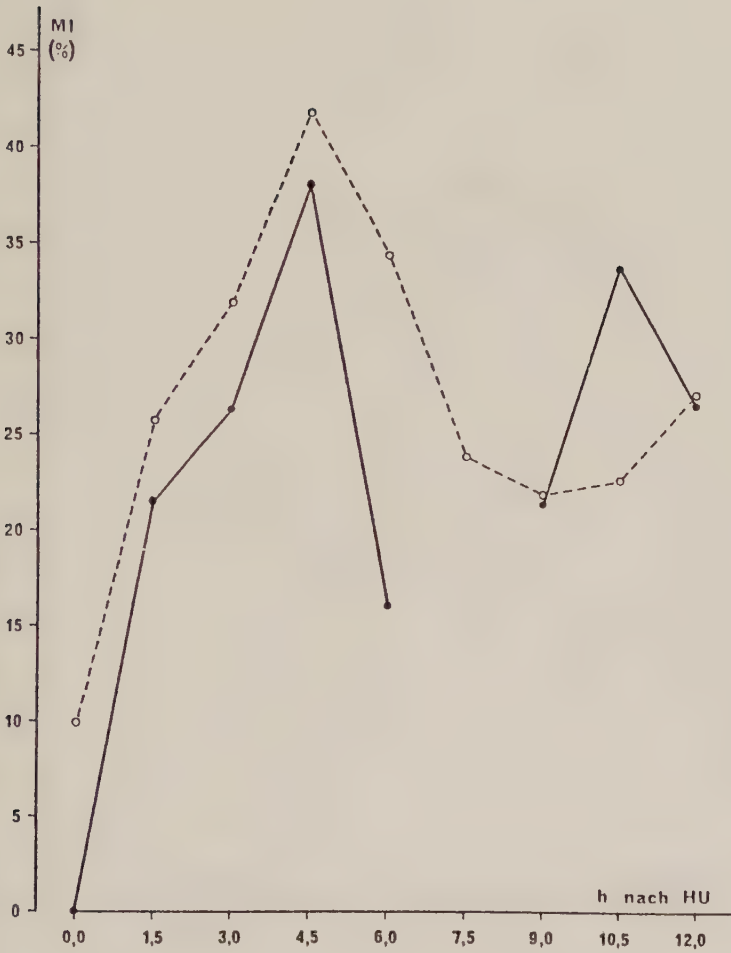


Abb. 18: Mittlerer Markierungsindex der GGT⁺ Foci zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU (³H-TdR-Pulsmarkierung).

● — ● PB⁻-Tiere

○ - - - ○ PB⁺-Tiere (Wagner, 1987)

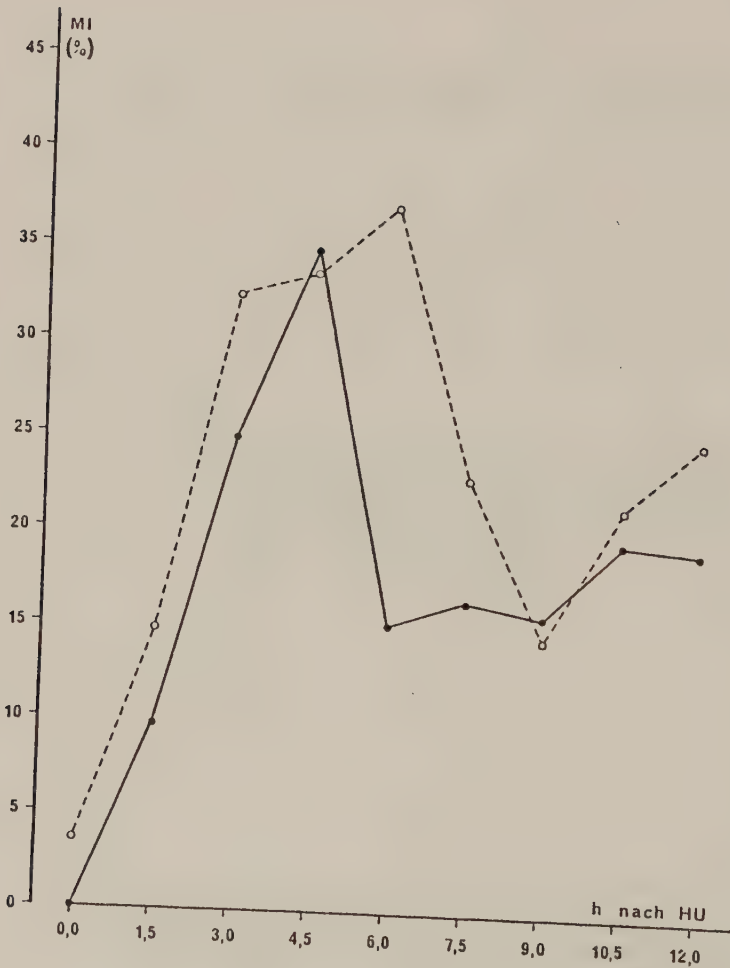


Abb. 19: Mittlerer Markierungsindex des Normalgewebes zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU (³H-TdR-Pulsmarkierung).

● — ● PB⁻-Tiere

○ - - - ○ PB⁺-Tiere (Wagner, 1987)

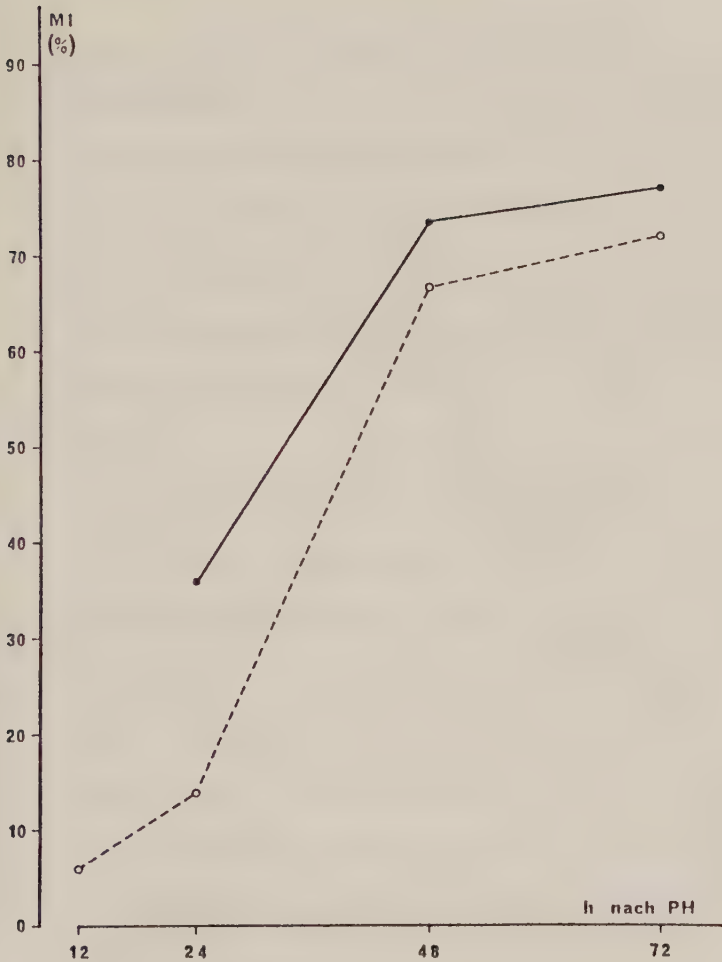


Abb. 20: Mittlerer Markierungsindex der GGT⁺ Foci zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH (³H-TdR-Dauermarkierung).

● — ● PB⁻-Tiere

○ - - - ○ PB⁺-Tiere (Wagner, 1987)

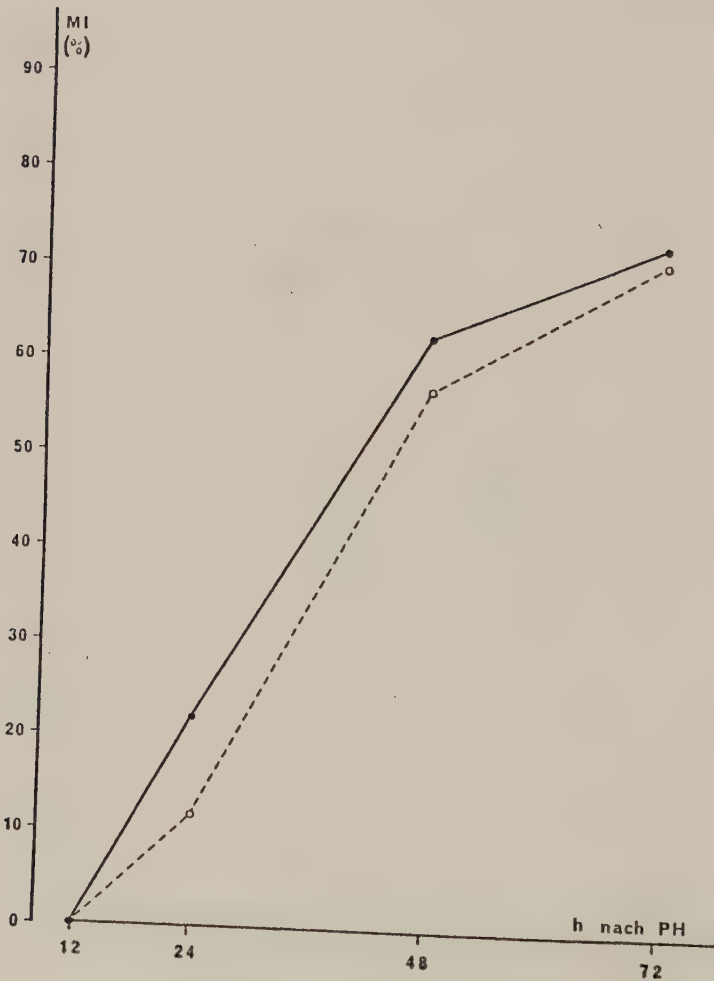


Abb. 21: Mittlerer Markierungsindex des Normalgewebes zu verschiedenen Zeitpunkten nach PH (³H-TdR-Dauermarkierung).

● — ● PB⁻-Tiere

○ - - - ○ PB⁺-Tiere (Wagner, 1987)

Ohne vorhergehende Teilhepatektomie zeigen die phenobarbitalbehandelten Ratten eine signifikant erhöhte Grundproliferation. Der Unterschied fällt in den GGT^+ Foci mit 1,1 % gegenüber 0,3 % erheblich größer aus als im Normalgewebe (0,3 % gegenüber 0,1 %). Offensichtlich führt Phenobarbital in den EAB zu einer stärkeren Proliferationszunahme als im Normalgewebe (vgl. Kitagawa und Sugano, 1978; Schulte-Hermann et al., 1981).

In den GGT^+ Foci der pulsmarkierten regenerierenden Leber (Abbildung 18) zeigen die Markierungsindices bis zum Erreichen des Maximalwerts einen nahezu synchronen Anstieg, bei durchgehend höheren Werten in den phenobarbitalbehandelten Ratten. Der folgende Rückgang zwischen 4,5 h und 6,0 h ist bei den PB^- -Tieren wesentlich deutlicher ausgeprägt als bei den PB^+ -Tieren: der Unterschied nimmt in dieser Zeit von knapp 4 % auf über 18 % zu und ist nun erstmals signifikant. Ein Minimum wird bei den PB^+ -Tieren erst 9,0 h nach HU erreicht. Der anschließende Wiederanstieg des MI ist in den PB^- -Tieren wesentlich steiler; zum Zeitpunkt 10,5 h besteht ein signifikanter Unterschied von über 11 %. Danach fällt bei den PB^- -Tieren der MI wieder ab, bei den PB^+ -Tieren steigt er weiter an.

Der zweite Peak bei 10,5 h in den PB^- -Tieren könnte auf eine Proliferationswelle von Zellen zurückzuführen

sein, die erst 34,5 h nach PH in die S-Phase eingetreten sind; es müßten Zellen sein, die im zentralen Fünftel des Leberlobulus lokalisiert sind (Rabes und Tuczek, 1970). Bei den PB^+ -Tieren scheint dieser zweite Anstieg verzögert zu sein; eine eindeutige Beurteilung ist aber nicht möglich, da spätere Zeitpunkte als 12 h nicht untersucht wurden. Träfe die Annahme eines verzögerten Wiederanstieges zu, so wäre sie ein Hinweis auf einen verspäteten S-Phasenbeginn bzw. eine verlängerte G_1 -Phase bei zentrolobulären Hepatozyten.

Der gegenüber PB^- -Tieren verlangsamte Abfall des MI nach 4,5 h läßt an eine durch Phenobarbital verlängerte S-Phase denken, doch ist eine sichere Aussage nicht möglich, da bei den PB^- -Tieren 7,5 h nach HU kein GGT^+ Bezirk gefunden werden konnte.

Deutlicher kommt ein solches Verhalten im Normalgewebe zum Ausdruck (Abbildung 19). Bei den PB^- -Tieren ist der maximale Markierungsindex 4,5 h nach HU erreicht, gefolgt von einer raschen Abnahme auf ein Minimum bei 6,0 h. Bei den PB^+ -Tieren hingegen findet sich der Höchstwert erst bei 6,0 h; zu diesem Zeitpunkt besteht ein signifikanter Unterschied von über 22 %. Der anschließende Rückgang dauert bis 9,0 h nach HU.

Es ist daher zu vermuten, daß Phenobarbital zu einer

Verlängerung der S-Phasendauer führt, die im Normalgewebe stärker ausgeprägt ist als in den EAB.

Im Widerspruch dazu steht die Erkenntnis von Tuczek et al. (1975), daß Phenobarbital keinen Einfluß auf die Dauer der S-Phase hat. Allerdings hatten diese Untersucher zuvor kein Carcinogen verabreicht. Es ist daher zu überlegen, ob eine S-Phasenverlängerung durch Phenobarbital an eine vorausgehende Carcinogenapplikation gebunden ist. Daß Carcinogenexposition zu einer Verlängerung der DNA-Synthesedauer in der Rattenleber führen kann, wurde für Acetylaminofluoren (AAF) gezeigt (Rotstein et al., 1984).

Bei der dauermarkierten Leber fällt sowohl in den GGT⁺ Foci (Abbildung 20) als auch im Normalgewebe (Abbildung 21) auf, daß die Markierungsindices bei den PB⁺-Tieren durchgehend unter den Vergleichswerten der PB⁻-Tiere bleiben. Der Unterschied ist in den EAB zum Zeitpunkt 24 h mit 22,1 % am größten (signifikant im U-Test). Auch im Normalgewebe weichen die 24-h-Werte am stärksten voneinander ab (10,4 %). Da sich zu diesem Zeitpunkt normalerweise die meisten Zellen in der S-Phase befinden (Rabes und Brändle, 1969), könnte dies ein Hinweis darauf sein, daß Phenobarbital zu einem verspäteten Beginn der DNA-Synthese führt. Die wesentlich geringeren Unterschiede zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h un-

terstützen diese Vermutung.

Daß zu diesem Zeitpunkt überhaupt noch Unterschiede bestehen, könnte auf erniedrigte Wachstumsfraktionen bei den PB^+ -Tieren hinweisen. Phenobarbital müßte dann bei einem Teil der Hepatozyten bewirken, daß sie nicht mehr auf den Wachstumsreiz PH reagieren. Dies steht im Widerspruch zu der Beobachtung von Rüttimann (1972), daß eine mehrmalige Phenobarbitalapplikation in der partiell hepatektomierten Leber die Zellproliferation stimuliert. Die Ergebnisse des Pulsmarkierungs-Versuchs (Abbildungen 18 und 19) liefern ebenfalls keine Anhaltspunkte für eine verminderte Proliferationsrate.

Es ist zu diskutieren, ob die erniedrigten Markierungsindices als Artefakt zu deuten sind. Eine mehrmalige Phenobarbitalapplikation führt zu einer Zunahme mischfunktioneller Oxydasen in den Hepatozyten (Remmer und Merker, 1963; Stäubli et al., 1969; Greim et al., 1970; Remmer, 1970). Dadurch könnte es zu einem vermehrten Metabolismus des infundierten 3H -TdR kommen. Die von der osmotischen Minipumpe abgegebene Menge von $1 \mu l/h$ könnte dann den Minimalwert unterschreiten, der für die Markierung aller DNA-synthetisierenden Hepatozyten erforderlich ist. Gegen diese Überlegung sprechen allerdings die Applikation einer relativ hohen 3H -TdR-Dosis pro Zeiteinheit sowie die relativ niedrige spezifische Aktivität des verwendeten 3H -TdR (s. Material und Methode).

Darüber hinaus muß berücksichtigt werden, daß die durch die Phenobarbital-Dauerapplikation gesteigerte Aktivität der mischfunktionellen Oxydasen durch eine PH wieder vermindert wird (Gram et al., 1968; Chiesara et al., 1970; Hilton und Sartorelli, 1970).

Tabelle 15 zeigt die durchschnittlichen EAB-Dichten (GGT^+ Bezirke) bei den phenobarbitalbehandelten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach Absetzen der HU-Infusion. In Abbildung 22 sind sie den eigenen Ergebnissen gegenübergestellt.

h nach	Anzahl der EAB		
	cm ² Schnittfläche		
HU	$\bar{x}$	$\pm$	SD
0,0	28,0	$\pm$	14,1
1,5	19,0	$\pm$	20,0
3,0	6,6	$\pm$	7,0
4,5	3,9	$\pm$	3,5
6,0	2,5	$\pm$	2,8
7,5	3,5	$\pm$	3,9
9,0	6,4	$\pm$	4,2
10,5	23,3	$\pm$	10,8
12,0	15,0	$\pm$	8,2
ohne PH	64,8	$\pm$	35,0

Tab. 15: Mittlere EAB-Dichte (GGT⁺ Bezirke) bei den phenobarbitalbehandelten Tieren zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU, sowie ohne PH (Werte aus Wagner, 1987).

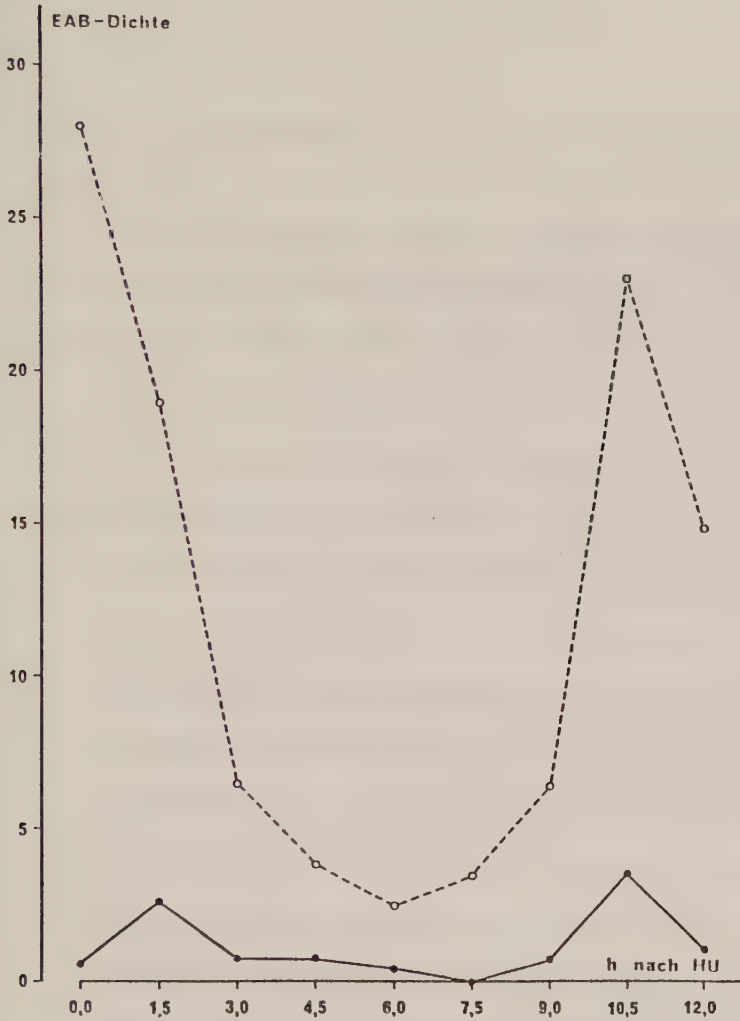


Abb. 22: Mittlere EAB-Dichte (GGT⁺ Bezirke) zu verschiedenen Zeitpunkten nach HU.

- — ● PB⁻-Tiere
○ - - - - ○ PB⁺-Tiere (Wagner, 1987)

Direkt nach Absetzen der HU-Infusion sowie bei den nicht teilhepatektomierten Kontrolltieren zeigt sich am deutlichsten, daß eine Phenobarbital-Dauerapplikation zu einer erheblichen Zunahme GGT⁺ Bezirke führt (vgl. Pitot et al., 1978; Pereira et al., 1984; Herren-Freund und Pereira, 1985; Schulte-Hermann et al., 1986).

Sowohl der Rückgang der EAB-Dichte zwischen 0,0 h und 6,0 h als auch der anschließende Wiederanstieg sind bei den PB⁺-Tieren wesentlich stärker ausgeprägt als bei den PB⁻-Tieren. 3,0 h, 4,5 h und 6,0 h nach HU finden sich, im Gegensatz zu den übrigen Zeitpunkten, keine signifikanten Unterschiede. Offensichtlich wird eine Verminderung der GGT-Aktivität während der S-Phase durch Phenobarbital noch verstärkt. Eine denkbare Erklärung hierfür wäre, daß die durch das Pharmakon induzierten mischfunktionellen Oxydasen (Remmer und Merker, 1963; Stäubli et al., 1969; Greim et al., 1970; Remmer, 1970) zu einem gesteigerten Abbau der GGT führen. Voraussetzung wäre allerdings, daß mischfunktionelle Oxydasen überhaupt am Abbau der GGT beteiligt sind. In der Literatur wurden hierfür keine Angaben gefunden.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Maligne Tumorzellen zeichnen sich durch autonomes Wachstum aus. Die Umwandlung normaler Körperzellen in Tumorzellen erfolgt in mehreren Stadien: Auf eine irreversible Genomschädigung, die Initiation, folgt eine präneoplastische Latenzperiode, die Promotionsphase. Während dieses Zeitraums können initiierte Zellen nach und nach charakteristische Eigenschaften der Malignität entwickeln; sie scheren progredient aus der Wachstumsregulation des Zellverbundes aus.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, am Modell der regenerierenden Rattenleber das Proliferationsverhalten präneoplastischer und normaler Hepatozyten nach einer partiellen Hepatektomie zu analysieren.

70 Wistar AF/Han Ratten wurden während 4 Wochen insgesamt 20 Einzeldosen von je 8 mg DÄNA/kg KG intraperitoneal injiziert. Nach einem 9ltägigen Intervall wurden Tiere der Gruppe "A" 2/3-teilhепatektomiert. 14 Stunden später erhielten sie eine 10stündige intravenöse Hydroxyharnstoff(HU)-Infusion, um den Beginn der DNA-Synthese in der regenerierenden Leber zu synchronisieren. Unmittelbar nach Absetzen des HU und weiter in 1,5-h-Ab-

ständen wurde jeweils 3 Tieren tritiummarkiertes Thymidin injiziert, um das S-Phasen-Kompartiment zu markieren.

Die Tiere der Gruppe "B" wurden lediglich teilhepatektomiert und anschließend mit Hilfe intraperitoneal implantierter osmotischer Minipumpen für 12, 24, 48 oder 72 h ^3H -TdR-dauerinfundiert, um die Wachstumsfraktion der Hepatozyten zu erfassen.

Unbehandelte Tiere der Kontrollgruppe "K" dienten zur Bestimmung der Proliferation ohne vorhergehenden Wachstumsstimulus.

Durch GGT- und ATPase-Färbung wurden enzymaberrante, präneoplastische Bezirke identifiziert. In GGT⁺ Bezirken und im Normalgewebe wurde der ^3H -TdR-Markierungsindex autoradiographisch bestimmt, um die Proliferationsraten zu ermitteln. Ferner wurden Flächenanteil und Dichte der EAB bezogen auf die Gesamtschnittfläche der enzymhistochemischen Präparate bestimmt.

Die Grundproliferation in der Leber nicht hepatektomierter Ratten ist sowohl in den GGT⁺ Foci als auch im Normalgewebe sehr gering. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Zellpopulationen konnten nicht gefunden werden.

In der HU-synchronisierten regenerierenden Leber nehmen die Markierungsindices sowohl in den GGT⁺ Bezirken als auch im Normalgewebe bis zu einem Maximum bei 4,5 h kontinuierlich zu, fallen danach rasch ab und steigen zwischen 9,0 h und 10,5 h erneut an. Auch in der mit ³H-TdR dauermarkierten Leber zeigen EAB und Normalgewebe einen ähnlichen zeitlichen Ablauf der Proliferation: Bis 24 h nach PH nehmen die Markierungsindices rasch zu, danach fällt der Anstieg geringer aus. Diese Befunde deuten darauf hin, daß präneoplastische Hepatozyten in gleicher Art auf den Wachstumsreiz einer partiellen Hepatektomie ansprechen wie normale Hepatozyten. Eine eindeutige Störung der Wachstumsregulation, die auf eine Wachstumsautonomie hinweist, ist 3 Monate nach einer 20tägigen Carcinogenexposition mit DÄNA nicht zu erkennen.

In den teilhepatektomierten Ratten weisen jedoch GGT⁺ Bezirke durchgehend höhere mittlere ³H-TdR-Markierungsindices auf als das Normalgewebe. Dies unterstreicht die Hypothese, daß präneoplastische Leberzellen gegenüber normalen Leberzellen einen Wachstumsvorteil besitzen. Die Markierungsindices liegen sowohl in den EAB als auch im Normalgewebe deutlich unter Vergleichswerten bei nicht carcinogenbehandelten Ratten. Es wird daher vermutet, daß die temporäre DÄNA-Exposition eine

persistierende relative Wachstumshemmung induziert, die normale Zellen stärker betrifft als präneoplastische. Da die letztmalige Carcinogenexposition 3 Monate vor der Teilhepatektomie erfolgte, kann diese Wirkung nicht auf eine akute Toxizität des DÄNA zurückgeführt werden.

In der Frühphase der Präneoplasie könnte die Wachstumsaberration initiiertter Zellen darin bestehen, daß sie bereits ein endogenes Wachstumspotential besitzen, nach einem Proliferationsstimulus jedoch noch in die Wachstumsregulation im Zellverbund eingegliedert sind. Ein allmählicher Verlust dieser Wachstumskoordination in späteren Stadien der Präneoplasie könnte den Übergang in die Malignität darstellen.

An der HU-synchronisierten Leber wird während der S-Phase ein Rückgang der Dichte von GGT⁺ Bezirken und ein Anstieg der Dichte von ATPase⁻ Foci beobachtet. Als mögliche Erklärung für dieses Verhalten wird eine während der DNA-Replikation verminderte Synthese dieser Enzyme diskutiert.

Eine zellzyklusabhängige Instabilität von GGT und ATPase könnte die Aussagekraft dieser Markerenzyme für quantitative enzymhistochemische Untersuchungen in Frage stellen.

G. LITERATURVERZEICHNIS

- Abbott, P.J., and Saffhill, R.: DNA synthesis with methylated poly(dC-dG) templates. Evidence for a competitive nature to miscoding by O⁶-methylguanine. *Biochim. Biophys. Acta* 562, 51-61 (1979).
- Altmann, H.-W.: Der Zellersatz, insbesondere an den parenchymatösen Organen. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 50, 15-51 (1966).
- Amlacher, E.: Autoradiographie in Histologie und Zytologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1974.
- Bannasch, P.: Preneoplastic lesions as end points in carcinogenicity testing. I. Hepatic preneoplasia. *Carcinogenesis* 7, 689-695 (1986).
- Barbason, H., and Betz, E.H.: Proliferation of preneoplastic lesions after discontinuation of chronic DEN feeding in the development of hepatomas in rat. *Br. J. Cancer* 44, 561-566 (1981).
- Barbason, H., Rassenfosse, C., and Betz, E.H.: Promotion mechanism of phenobarbital and partial hepatectomy in DENA hepatocarcinogenesis cell kinetics effect. *Br. J. Cancer* 47, 517-525 (1983).
- Barranco, S.C., and Novak, J.K.: Survival responses of dividing and nondividing mammalian cells after treatment with hydroxyurea, arabinosylcytosine, or adriamycin. *Cancer Res.* 34, 1616-1618 (1974).

Berenblum, I.: The cocarcinogenic action of croton resin.

Cancer Res. 1, 44-48 (1941).

Berenblum, I.: Sequential aspects of chemical carcinogenesis: Skin.

In: F.F. Becker (ed.): Cancer: A comprehensive treatise, vol. I, pp. 323-344, Plenum Press, New York (1975).

Berenblum, I.: Established principles and unresolved problems in carcinogenesis.

J. Natl. Cancer Inst. 60, 723-726 (1978).

Bertram, J.S., and Heidelberger, C.: Cell cycle dependency of oncogenic transformation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in culture.

Cancer Res. 34, 526-537 (1974).

Bhuyan, B.K., Fraser, T.J., Gray, L.G., Kuentzel, S.L., and Neil, G.L.: Cell-kill kinetics of several S-phase-specific drugs.

Cancer Res. 33, 888-894 (1973).

Bone, S.N., III, Michalopoulos, G., and Jirtle, R.L.: Ability of partial hepatectomy to induce γ -glutamyl-transpeptidase in regenerated and transplanted hepatocytes of Fischer 344 and Wistar-Furth rats.

Cancer Res. 45, 1222-1228 (1985).

Borenfreund, E., Krim, M., and Bendich, A.: Chromosomal aberrations induced by hyponitrite and hydroxylamine derivatives.

J. Natl. Cancer Inst. 32, 667-679 (1964).

- Bradley, M.O., Dysart, G., Fitzsimmons, K., Harbach, P., Lewin, J., and Wolf, G.: Measurements by filter elution of DNA single- and double-strand breaks in rat hepatocytes: effects of nitrosamines and γ -irradiation.
Cancer Res. 42, 2592-2597 (1982).
- Brues, A.M., and Marble, B.B.: An analysis of mitosis in liver restoration.
J. Exp. Med. 65, 15-27 (1937).
- Bucher, N.L.R.: Experimental aspects of hepatic regeneration.
New Engl. J. Med. 13, 686-695 (1967).
- Bucher, N.L.R., Swaffield, M.N., and DiTroja, J.F.: The influence of age upon the incorporation of thymidine-2-C¹⁴ into the DNA of regenerating rat liver.
Cancer Res. 24, 509-512 (1964).
- Cameron, R., Kellen, J., Kolin, A., Malkin, A., and Farber, E.: γ -Glutamyltransferase in putative premalignant liver cell populations during hepatocarcinogenesis.
Cancer Res. 38, 823-829 (1978).
- Cater, D.B., Holmes, B.E., and Mee, L.K.: Cell division and nucleic acid synthesis in the regenerating liver of the rat.
Acta radiol. 46, 655-667 (1956).
- Chiesara, E., Conti, F., Meldolesi, J.: Influence of partial hepatectomy on the induction of liver microsomal drug-metabolizing enzymes produced by phenobarbital. A biochemical and ultrastructural study.
Lab. Invest. 22, 329-338 (1970).

- Columbano, A., Rajalakshmi, S., and Sarma, D.S.R.: Requirement of cell proliferation for the initiation of liver carcinogenesis as assayed by three different procedures.
Cancer Res. 41, 2079-2083 (1981).
- Coyle, M.B., and Strauss, B.: Cell killing and the accumulation of breaks in the DNA of HEp-2 cells incubated in the presence of hydroxyurea.
Cancer Res. 30, 2314-2319 (1970).
- Craddock, V.M.: Effect of a single treatment with the alkylating carcinogens dimethylnitrosamine, diethylnitrosamine and methyl methanesulphonate, on liver regeneration after partial hepatectomy. II. Alkylation of DNA and inhibition of DNA-replication.
Chem.-Biol. Interactions 10, 323-332 (1975).
- Craddock, V.M., and Frei, J.V.: Induction of liver cell adenomata in the rat by a single treatment with N-methyl-N-nitroso-urea given at various times after partial hepatectomy.
Br. J. Cancer 30, 503-511 (1974).
- Druckrey, H., Preussmann, R., Schmährl, D. und Müller, M.: Chemische Konstitution und carcinogene Wirkung bei Nitrosaminen.
Naturwissenschaften 48, 134-135 (1961).
- Druckrey, H., Preussmann, R., Ivankovic, S. und Schmährl, D.: Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten.
Z. Krebsforsch. 69, 103-201 (1967).
- Emmelot, P., and Scherer, E.: The first relevant cell stage in rat liver carcinogenesis. A quantitative approach.
Biochim. Biophys. Acta 605, 247-304 (1980).

Enomoto, K., and Farber, E.: Kinetics of phenotypic maturation of remodeling of hyperplastic nodules during liver carcinogenesis.
Cancer Res. 42, 2330-2335 (1982).

Fabrikant, J.I.: The kinetics of cellular proliferation in regenerating liver.
J. Cell Biol. 36, 551-565 (1968).

Farber, E.: Biochemistry of carcinogenesis.
Cancer Res. 28, 1859-1869 (1968).

Farber, E.: The sequential analysis of liver cancer induction.
Biochim. Biophys. Acta 605, 149-166 (1980).

Farber, E.: Cellular biochemistry of the stepwise development of cancer with chemicals: G.H.A. Clowes Memorial lecture.
Cancer Res. 44, 5463-5474 (1984).

Farber, E., Hartman, S.P., Solt, D., and Cameron, R.: Precancerous liver cell population and their identification.
In: P.N. Magee et al. (eds.): Fundamentals in cancer prevention, pp. 71-87, Univ. of Tokyo Press, Tokyo/Univ. Park Press, Baltimore (1976a).

Farber, E., Parker, S., and Gruenstein, M.: The resistance of putative premalignant liver cell populations, hyperplastic nodules, to the acute cytotoxic effects of some hepatocarcinogens.
Cancer Res. 36, 3879-3887 (1976b).

Fiala, S., and Fiala, E.S.: Activation by chemical carcinogens of γ -glutamyl transpeptidase in rat and mouse liver.
J. Natl. Cancer Inst. 51, 151-158 (1973).

Fischer, G., Katz, N., Fischer, W., and Schauer, A.: Biochemical quantification of ATPase activities during liver carcinogenesis.
Cancer Detect. Prev. 5, 73 (1982).

Fischer, G., Lilienblum, W., Uldrich, D., and Bock, K.W.: Immunohistochemical differentiation of gamma-glutamyltranspeptidase in focal lesions and in zone I of rat liver after treatment with chemical carcinogens.
Carcinogenesis 7, 1405-1410 (1986).

Friedrich-Frekса, H., Gössner, W. und Börner, P.: Histochemische Untersuchungen der Cancerogenese in der Rattenleber nach Dauergaben von Diäthylnitrosamin.
Z. Krebsforsch. 72, 226-239 (1969).

Gerchman, L.L., and Ludlum, D.B.: The properties of O^6 -methylguanine in templates for RNA polymerase.
Biochim. Biophys. Acta 308, 310-316 (1973).

Glauert, H.P., Schwarz, M., and Pitot, H.C.: The phenotypic stability of altered hepatic foci: effect of the short-term withdrawal of phenobarbital and of the long-term feeding of purified diets after the withdrawal of phenobarbital.
Carcinogenesis 7, 117-121 (1986).

Gössner, W. und Friedrich-Frekса, H.: Histochemische Untersuchungen über die Glucose-6-Phosphatase in der Rattenleber während der Kanzerisierung durch Nitrosamine.
Z. Naturforsch. 19b, 862-863 (1964).

- Goth, R., and Rajewsky, M.F.: Molecular and cellular mechanism associated with pulse-carcinogenesis in the rat nervous system by ethylnitrosourea: ethylation of nucleic acids and elimination rates of ethylated bases from the DNA of different tissues.
Z. Krebsforsch. 82, 37-64 (1974).
- Gram, T.E., Guarino, A.M., Greene, F.E., Gigon, P.L., and Gillette, J.R.: Effect of partial hepatectomy on the responsiveness of microsomal enzymes and cytochrome P-450 to the phenobarbital or 3-methylcholanthrene.
Biochem. Pharmacol. 17, 1769-1778 (1968).
- Greim, H., Schenkman, J.B., Klotzbücher, M., and Remmer, H.: The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrome b₅ and cytochrome P-450 hemes in the rat.
Biochim. Biophys. Acta 201, 20-25 (1970).
- Grisham, J.W.: Inhibitory effect of tritiated thymidine on regeneration of the liver in the young rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105, 555-558 (1960).
- Grisham, J.W.: A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H³.
Cancer Res. 22, 842-849 (1962).
- Grisham, J.W., Greenberg, D.S., Kaufman, D.G., and Smith, G.J.: Cycle-related toxicity and transformation in 10T1/2 cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4813-4817 (1980).

- Hartmann, A.: Zellproliferation und Cancerogenese: Untersuchungen an der Rattenleber nach zweimaliger Hepatektomie und Zellsynchronisation durch Hydroxyharnstoff.
Dissertation München, 1981.
- Hendrich, S., Glauert, H.P., and Pitot, H.C.: The phenotypic stability of altered hepatic foci: effects of withdrawal and subsequent readministration of phenobarbital.
Carcinogenesis 7, 2041-2045 (1986).
- Herren-Freund, S.L., and Pereira, M.A.: Effect of phenobarbital on the gamma-glutamyltranspeptidase activity and the remodeling of nodules induced by the initiation-selection model.
Cancer Lett. 27, 153-161 (1985).
- Higgins, G.M., and Anderson, R.M.: Experimental pathology of the liver. I. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal.
Arch. Pathol. 12, 186-202 (1931).
- Hill, A.B., and Schimke, R.T.: Increased gene amplification in L5178Y mouse lymphoma cells with hydroxyurea-induced chromosomal aberrations.
Cancer Res. 45, 5050-5057 (1985).
- Hilton, J., and Sartorelli, A.C.: Induction by phenobarbital of microsomal mixed oxidase enzymes in regenerating rat liver.
J. Biol. Chem. 245, 4187-4192 (1970).
- Hoffmann, G.: Kurzer Abriß der Anatomie und Physiologie der Laboratoriumstiere.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1956.

Huberman, E., Montesano, R., Drevon, C., Kuroki, T., Vincent, L.St., Pugh, T.D., and Goldfarb, S.: γ -Glutamyl transpeptidase and malignant transformation of cultured liver cells.
Cancer Res. 39, 269-272 (1979).

Iseler, G.: Untersuchungen zur Synchronisation der DNA-Synthese in der regenerierenden Rattenleber nach Hydroxyharnstoff-Dauerbehandlung.
Dissertation München, 1977.

Jaffe, J.J.: Diurnal mitotic periodicity in regenerating rat liver.
Anat. Rec. 120, 935-954 (1954).

Kaufmann, W.K., Mackenzie, S.A., and Kaufman, D.G.: Quantitative relationship between hepatocytic neoplasms and islands of cellular alteration during hepatocarcinogenesis in the male F344 rat.
Am. J. Pathol. 119, 171-174 (1985).

Kim, J.H., Perez, A.G., and Djordjevic, B.: Studies on unbalanced growth in synchronized HeLa cells.
Cancer Res. 28, 2443-2447 (1968).

Kitagawa, T.: Responsiveness of hyperplastic lesions and hepatomas to partial hepatectomy.
Gann 62, 217-224 (1971).

Kitagawa, T.: Sequential phenotypic changes in hyperplastic areas during hepatocarcinogenesis in the rat.
Cancer Res. 36, 2534-2539 (1976).

- Kitagawa, T., and Sugano, H.: Combined enzyme histochemical and radioautographic studies on areas of hyperplasia in the liver of rats fed N-2-fluorenylacetylamide.
Cancer Res. 33, 2993-3001 (1973).
- Kitagawa, T., and Pitot, H.C.: The regulation of serine dehydratase and glucose-6-phosphatase in hyperplastic nodules of rat liver during diethylnitrosamine and N-2-fluorenylacetylamide feeding.
Cancer Res. 35, 1075-1084 (1975).
- Kitagawa, T., and Sugano, H.: Enhancing effect of phenobarbital on the development of enzyme-altered islands and hepatocellular carcinomas initiated by 3'-methyl-4-(dimethylamino)azobenzene or diethylnitrosamine.
Gann 69, 679-687 (1978).
- Kitagawa, T., Pitot, H.C., Miller, E.C., and Miller, J.A.: Promotion by dietary phenobarbital of hepatocarcinogenesis by 2-methyl-N,N-dimethyl-4-aminoazobenzene in the rat.
Cancer Res. 39, 112-115 (1979).
- Kitagawa, T., Imai, F., and Sato, K.: Reevaluation of gamma-glutamyl-transpeptidase activity in periportal hepatocytes of rats with age.
Gann 71, 362-366 (1980).
- Kleihues, P., and Margison, G.P.: Carcinogenicity of N-methyl-N-nitrosourea: possible role of excision repair of O⁶-methylguanine from DNA.
J. Natl. Cancer Inst. 53, 1839-1841 (1974).
- Klinge, O. und Mathyl, J.: Tageszeitliche Mitose-Rhythmen in der teilektomierten Rattenleber.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 2, 154-162 (1969).

Koen, H., Pugh, T.D., Nychka, D., and Goldfarb, S.: Presence of α -fetoprotein-positive cells in hepatocellular foci and microcarcinomas induced by single injections of diethylnitrosamine in infant mice. *Cancer Res.* 43, 702-708 (1983).

Krakoff, I.H., Brown, N.C., and Reichard, P.: Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.* 28, 1559-1565 (1968).

Kunz, H.W., Tennekes, H.A., Port, R.E., Schwartz, M., Lorke, D., Schaudé, G.: Quantitative aspects of chemical carcinogenesis and tumor promotion in liver. *Environ. Health Perspect.* 50, 113-122 (1983).

Laishes, B.A., Ogawa, K., Roberts, E., and Farber, E.: Gamma-glutamyl transpeptidase: a positive marker for cultured rat liver cells derived from putative premalignant and malignant lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* 60, 1009-1016 (1978).

Leduc, E.H.: Regeneration of the liver.
In: C. Rouiller (ed.): *The liver: morphology, biochemistry, physiology*, vol. II, pp. 63-89, Academic Press, New York (1964).

Lennartz, K.J.: Grundlagen, Technik und Anwendungsreich der Autoradiographie.
MTA 4, 153-163 (1978).

Loveless, A.: Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 223, 206-207 (1969).

- Luetteke, N.C., and Michalopoulos, G.K.: Partial purification and characterization of a hepatocyte growth factor produced by rat hepatocellular carcinoma cells.
Cancer Res. 45, 6331-6337 (1985).
- Magee, P.N., and Barnes, J.M.: The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine.
Br. J. Cancer 10, 114-122 (1956).
- Magee, P.N., and Barnes, J.M.: Induction of kidney tumours in the rat with dimethylnitrosamine (N-nitroso-dimethylamine).
J. Pathol. Bacteriol. 84, 19-31 (1962).
- Magee, P.N., and Farber, E.: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acids by dimethylnitrosamine in vivo.
Biochem. J. 83, 114-124 (1962).
- Magee, P.N., Pegg, A.E., and Swann, P.F.: Molecular mechanisms of chemical carcinogenesis.
In: Handb. Allg. Path., Band 6, Geschwülste II/6, pp. 329-419, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1975).
- Margison, G.P., Curtin, N.J., Snell, K., and Craig, A.W.: Effect of chronic N,N-diethylnitrosamine on the excision of O⁶-ethylguanine from rat liver DNA.
Br. J. Cancer 40, 809-813 (1979).
- Mehta, J.R., and Ludlum, D.B.: Synthesis and properties of O⁶-methyldeoxyguanylic acid and its copolymers with deoxycytidylic acid.
Biochim. Biophys. Acta 521, 770-778 (1978).

Miller, J.A.: Carcinogenesis by chemicals: an overview.
G.H.A. Clowes memorial lecture.
Cancer Res. 30, 559-576 (1970).

Miller, E.C., and Miller, J.A.: Biochemical mechanisms
of chemical carcinogenesis.
In: H. Busch (ed.): The molecular biology of cancer,
pp. 377-402, Academic Press, New York and London
(1974).

Montesano, R., Bresil, H., and Margison, G.P.: In-
creased excision of O⁶-methylguanine from rat liver
DNA after chronic administration of dimethylnitros-
amine.
Cancer Res. 39, 1798-1802 (1979).

Montesano, R., Bresil, H., Planche-Martel, G., Margi-
son, G.P., and Pegg, A.E.: Effect of chronic treat-
ment of rats with dimethylnitrosamine on the removal
of O⁶-methylguanine from DNA.
Cancer Res. 40, 452-458 (1980).

Moran, R.E., and Straus, M.J.: Cytokinetic analysis of
L1210 leukemia after continuous infusion of hydroxy-
urea in vivo.
Cancer Res. 39, 1616-1622 (1979).

Müller, L., and Rabes, H.M.: Cell cycle dependent ini-
tiation of ATPase-deficient preneoplastic cell popu-
lations in regenerating rat liver.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 105, A 22 (1983).

Neuhard, J.: Studies on the acid-soluble nucleotide
pool in Escherichia coli. IV. Effects of hydroxy-
urea.
Biochim. Biophys. Acta 145, 1-6 (1967).

Nicoll, J.W., Swann, P.F., and Pegg, A.E.: Effect of dimethylnitrosamine on persistence of methylated guanines in rat liver and kidney DNA.
Nature 254, 261-262 (1975).

Oehlert, W., Hämmerling, W. und Büchner, F.: Der zeitliche Ablauf und das Ausmaß der Desoxyribonukleinsäure-Synthese in der regenerierenden Leber der Ratte nach Teilhepatektomie.
Beitr. path. Anat. 126, 91-112 (1962).

Ogawa, K., Solt, D.B., and Farber, E.: Phenotypic diversity as an early property of putative preneoplastic hepatocyte populations in liver carcinogenesis.
Cancer Res. 40, 725-733 (1980).

Okita, K., Gruenstein, M., Klaiber, M., and Farber, E.: Localization of α -fetoprotein by immunofluorescence in hyperplastic nodules during hepatocarcinogenesis induced by 2-acetylaminofluorene.
Cancer Res. 34, 2758-2763 (1974).

Olsson, M., and Lindahl, T.: Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O⁶-methylguanine to a protein cysteine residue.
J. Biol. Chem. 255, 10569-10571 (1980).

Oppenheim, J.J., and Fishbein, W.N.: Induction of chromosome breaks in cultured normal human leukocytes by potassium arsenite, hydroxyurea and related compounds.
Cancer Res. 25, 980-985 (1965).

Paulini, K., Beneke, G. und Kulka, R.: Zytophotometrische und autoradiographische Untersuchungen zur Lebervergrößerung nach Phenobarbital in Abhängigkeit vom Lebensalter.
Beitr. path. Anat. 144, 319-326 (1971).

- Pegg, A.E.: Formation and metabolism of alkylated nucleosides: possible role in carcinogenesis by nitroso compounds and alkylating agents.
In: G. Klein and S. Weinhouse (eds.): Advances in cancer research, vol. 25, pp. 195-269, Academic Press, New York, San Francisco, London (1977).
- Pegg, A.E., Perry, W., and Bennett, R.A.: Effect of partial hepatectomy on removal of O⁶-methylguanine from alkylated DNA by rat liver extracts.
Biochem. J. 197, 195-201 (1981).
- Pegg, A.E., Roberfroid, M., von Bahr, C., Foote, R.S., Mitra, S., Bresil, H., Likhachev, A., and Montesano, R.: Removal of O⁶-methylguanine from DNA by human liver fractions.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5162-5165 (1982).
- Pegg, A.E., Wiest, L., Foote, R.S., Mitra, S., and Perry, W.: Purification and properties of O⁶-methylguanine-DNA transmethylase from rat liver.
J. Biol. Chem. 258, 2327-2333 (1983).
- Peraino, C., Fry, R.J.M., and Staffeldt, E.: Reduction and enhancement by phenobarbital of hepatocarcinogenesis induced in the rat by 2-acetylaminofluorene.
Cancer Res. 31, 1506-1512 (1971).
- Peraino, C., Fry, R.J.M., Staffeldt, E., and Kisielleski, W.E.: Effects of varying the exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis in the rat.
Cancer Res. 33, 2701-2705 (1973).
- Peraino, C., Fry, R.J.M., and Staffeldt, E.: Effects of varying the onset and duration of exposure to phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis.
Cancer Res. 37, 3623-3627 (1977).

- Peraino, C., Staffeldt, E.F., Haugen, D.A., Lombard, L.S., Stevens, F.J., and Fry, R.J.M.: Effects of varying the dietary concentration of phenobarbital on its enhancement of 2-acetylaminofluorene-induced hepatic tumorigenesis.
Cancer Res. 40, 3268-3273 (1980).
- Pereira, M.A., Savage, R.E., Jr., Herren, S.L., and Guion, C.W.: Comparison of enhancement of GGTase-positive foci and induction of ornithine decarboxylase in rat liver by barbiturates.
Carcinogenesis 3, 147-150 (1982).
- Pereira, M.A., Herren-Freund, S.L., Britt, R.L., and Khoury, M.M.: Effect of coadministration of phenobarbital sodium on N-nitrosodiethylamine-induced γ -glutamyltransferase-positive foci and hepatocellular carcinoma in rats.
J. Natl. Cancer Inst. 72, 741-744 (1984).
- Peters, R.: Die Mitosehäufigkeit in der Rattenleber in Abhängigkeit von der Tageszeit, dem Gewicht der Tiere und der Ernährung.
Z. Naturforsch. 17b, 164-168 (1962).
- Pfeiffer, S.E., and Tolmach, L.J.: Inhibition of DNA synthesis in HeLa cells by hydroxyurea.
Cancer Res. 27, 124-129 (1967).
- Philips, F.S., Sternberg, S.S., Schwartz, H.S., Cronin, A.T., Sodergren, J.E., and Vidal, P.N.: Hydroxyurea. I. Acute cell death in proliferating tissues in rats.
Cancer Res. 27, 61-74 (1967).

Pitot, H.C., Barsness, L., Goldsworthy, T., and Kitagawa, T.: Biochemical characterisation of stages of hepatocarcinogenesis after a single dose of diethylnitrosamine.
Nature 271, 456-458 (1978).

Pitot, H.C., and Sirica, A.E.: The stages of initiation and promotion in hepatocarcinogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 605, 191-215 (1980).

Planche-Martel, G., Likhachev, A., Wild, C.P., and Montesano, R.: Modulation of repair of O⁶-methylguanine in parenchymal and nonparenchymal liver cells of rats treated with dimethylnitrosamine.
Cancer Res. 45, 4768-4773 (1985).

Post, J., and Hoffman, J.: Dose-dependent effects of ³H-TdR as a DNA label on the replication of liver cells in the growing rat.
Radiation Res. 26, 422-441 (1965).

Post, J., and Hoffman, J.: Late effects of ³H-TdR as a DNA label on liver cell replication.
Radiation Res. 30, 748-758 (1967).

Pugh, T.D., and Goldfarb, S.: Quantitative histochemical and autoradiographic studies of hepatocarcinogenesis in rats fed 2-acetylaminofluorene followed by phenobarbital.
Cancer Res. 38, 4450-4457 (1978).

Rabes, H.M.: Beeinflussung der Proliferationsaktivität normaler und maligner Gewebe durch Hypophysektomie.
Z. Krebsforsch. 72, 176-184 (1969).

- Rabes, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation after partial resection of the liver..
In: H. Popper and F. Schaffner (eds.): Progress in liver diseases, vol. V, pp. 83-99, Grune & Stratton, New York, San Francisco, London (1976).
- Rabes, H.M.: Kinetics of hepatocellular proliferation as a function of the microvascular structure and functional state of the liver.
In: Hepatotrophic factors, vol. 55, pp. 31-59, Elsevier/Excerpta Medica/North-Holland and Elsevier/North-Holland Inc. (1978).
- Rabes, H.M.: Proliferative Vorgänge während der Frühstadien der malignen Transformation.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 63, 18-39 (1979).
- Rabes, H.M.: Development and growth of early preneoplastic lesions induced in the liver by chemical carcinogens.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 106, 85-92 (1983).
- Rabes, H.M.: DNA adducts and cell cycle.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 112, 189-195 (1986).
- Rabes, H.M., and Brändle, H.: Synthesis of RNA, protein, and DNA in the liver of normal and hypophysectomized rats after partial hepatectomy.
Cancer Res. 29, 817-822 (1969).
- Rabes, H.M., Hartenstein, R. und Scholze, P.: Hemmung der Proliferationsaktivität partiell resezierter Leber durch Diäthylnitrosamin.
Z. Krebsforsch. 73, 239-241 (1970a).

- Rabes, H.M., Hartenstein, R., and Scholze, P.: Specific stages of cellular response to homeostatic control during diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. *Experientia* 26, 1356-1359 (1970b).
- Rabes, H.M. und Tuczek, H.V.: Quantitative autoradiographische Untersuchung zur Heterogenität der Leberzellproliferation nach partieller Hepatektomie. *Virchows Arch. Abt. B Zellpath.* 6, 302-312 (1970).
- Rabes, H.M., Wirsching, R. und Tuczek, H.V.: Dauer des Leberzellzyklus nach partieller Hepatektomie. *Naturwissenschaften* 59, 221-222 (1972a).
- Rabes, H.M., Scholze, P., and Jantsch, B.: Growth kinetics of diethylnitrosamine-induced, enzyme-deficient "preneoplastic" liver cell populations in vivo and in vitro. *Cancer Res.* 32, 2577-2586 (1972b).
- Rabes, H.M., Iseler, G., Tuczek, H.V., and Kerler, R.: Increased synchrony of DNA synthesis in regenerating rat liver after continuous infusion of hydroxyurea. *Experientia* 30, 1116-1117 (1974).
- Rabes, H.M., Iseler, G. und Tuczek, H.V.: Induzierte Synchronie von Zellzyklusphasen in der regenerierenden Rattenleber. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 59, 459 (1975).
- Rabes, H.M., Wirsching, R., Tuczek, H.V., and Iseler, G.: Analysis of cell cycle compartments of hepatocytes after partial hepatectomy. *Cell Tissue Kinet.* 9, 517-532 (1976).

- Rabes, H.M., Iseler, G., Czichos, S., and Tuczek, A.V.: Synchronization of hepatocellular DNA synthesis in regenerating rat liver by continuous infusion of hydroxyurea. Cancer Res. 37, 1105-1111 (1977).
- Rabes, H.M., and Szymkowiak, R.: Cell kinetics of hepatocytes during the preneoplastic period of diethylnitrosamine-induced liver carcinogenesis. Cancer Res. 39, 1298-1304 (1979).
- Rabes, H.M., Bücher, Th., Hartmann, A., Linke, I., and Dünwald, M.: Clonal growth of carcinogen-induced enzyme-deficient preneoplastic cell populations in mouse liver. Cancer Res. 42, 3220-3227 (1982a).
- Rabes, H.M., Wilhelm, R., Kerler, R., and Rode, G.: Dose- and cell cycle-dependent O⁶-methylguanine elimination from DNA in regenerating rat liver after ¹⁴C-dimethylnitrosamine injection. Cancer Res. 42, 3814-3821 (1982b).
- Rabes, H.M., Kerler, R., and Wilhelm, R.: DNA alkylation and tumor induction in regenerating rat liver after cell cycle-related continuous N-nitrosodimethylamine infusion. J. Natl. Cancer Inst. 70, 193-198 (1983).
- Rabes, H.M., Kerler, R., Schuster, C., Rode, G., Legner, M., Müller, L., and Bücher, T.: Cell proliferation and DNA repair in the liver during early stages of chemical carcinogenesis. In: G. Weber (ed.): Advances in enzyme regulation, vol. 23, pp. 241-262, Pergamon Press, Oxford, New York (1985).

- Rabes, H.M., Müller, L., Hartmann, A., Kerler, R., and Schuster, C.: Cell cycle-dependent initiation of adenosine triphosphatase-deficient populations in adult rat liver by a single dose of N-methyl-N-nitroso-urea.
Cancer Res. 46, 645-650 (1986).
- Remmer, H.: The role of the liver in drug metabolism.
Am. J. Med. 49, 617-629 (1970).
- Remmer, H., and Merker, H.J.: Drug-induced changes in the liver endoplasmic reticulum: association with drug-metabolizing enzymes.
Science 142, 1657-1658 (1963).
- Robins, P., and Cairns, J.: Quantitation of the adaptive response to alkylating agents.
Nature 280, 74-76 (1979).
- Rotstein, J., Macdonald, P.D.M., Rabes, H.M., and Farber, E.: Cell cycle kinetics of rat hepatocytes in early putative preneoplastic lesions in hepatocarcinogenesis.
Cancer Res. 44, 2913-2917 (1984).
- Rous, P., and Kidd, J.G.: Conditional neoplasms and sub-threshold neoplastic states.
J. Exp. Med. 73, 365-390 (1941).
- Rüttimann, G.: Effect of phenobarbital on hepatocyte proliferation in rats following partial hepatectomy.
Experientia 28, 1196-1197 (1972).

- Russell, J.J., Staffeldt, E.F., Wright, B.J., Prapoulos, A., Carnes, B.A., and Peraino, C.: Effects of rat strain, diet composition, and phenobarbital on hepatic γ -glutamyl transpeptidase histochemistry and on the induction of altered hepatocyte foci and hepatic tumors by diethylnitrosamine.
Cancer Res. 47, 1130-1134 (1987).
- Rutenburg, A.M., Kim, H., Fischbein, J.W., Hanker, J.S., Wasserkrug, H.L., and Seligman, A.M.: Histochemical and ultrastructural demonstration of γ -glutamyl transpeptidase activity.
J. Histochem. Cytochem. 17, 517-526 (1969).
- Sachs, L.: Statistische Auswertungsmethoden, 2. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1969).
- Samson, L., and Cairns, J.: A new pathway for DNA repair in *Escherichia coli*.
Nature 267, 281-283 (1977).
- Schauer, A. und Kunze, E.: Enzymhistochemische und autoradiographische Untersuchungen während der Cancerisierung der Rattenleber mit Diäthylnitrosamin.
Z. Krebsforsch. 70, 252-266 (1968).
- Scherer, E.: Neoplastic progression in experimental hepatocarcinogenesis.
Biochim. Biophys. Acta 738, 219-236 (1984).
- Scherer, E., Hoffmann, M., Emmelot, P., and Friedrich-Freksa, M.: Quantitative study on foci of altered liver cells induced in the rat by a single dose of diethylnitrosamine and. partial hepatectomy.
J. Natl. Cancer Inst. 49, 93-106 (1972).

- Scherer, E., and Emmelot, P.: Foci of altered liver cells induced by a single dose of diethylnitrosamine and partial hepatectomy: their contribution to hepatocarcinogenesis in the rat.
Europ. J. Cancer 11, 145-154 (1975).
- Scherer, E., and Emmelot, P.: Kinetics of induction and growth of enzyme-deficient islands involved in hepatocarcinogenesis.
Cancer Res. 36, 2544-2554 (1976).
- Schmähl, D., Preussmann, R. und Hamperl, H.: Leberkrebs-erzeugende Wirkung von Diäthylnitrosamin nach oraler Gabe bei Ratten.
Naturwissenschaften 47, 89 (1960).
- Schmidkonz, P., Hübner, G. und Rabes. H.M.: Morphometrische Untersuchungen zur hepatozellulären Hypertrophie bei Hydroxyharnstoff-induziertem "unbalanced growth".
Verh. Dtsch. Ges. Path. 61, 473 (1977).
- Schulte-Hermann, R., Ohde, G., Schuppler, J., and Timmermann-Trosiener, I.: Enhanced proliferation of putative preneoplastic cells in rat liver following treatment with the tumor promoters phenobarbital, hexachlorocyclohexane, steroid compounds, and nafenopin.
Cancer Res. 41, 2556-2562 (1981).
- Schulte-Hermann, R., Timmermann-Trosiener, I., and Schuppler, J.: Facilitated expression of adaptive responses to phenobarbital in putative pre-stages of liver cancer.
Carcinogenesis 7, 1651-1655 (1986).

- Schultze, B.: Die Orthologie und Pathologie des Nuclein-säure- und Eiweißstoffwechsels der Zelle im Autoradiogramm.
In: Handb. Allg. Path., Band 2/5, pp. 466-670, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1968).
- Schuster, C., Rode, G., and Rabes, H.M.: O⁶-methylguanine repair of methylated DNA in vitro: cell cycle-dependence of rat liver methyltransferase activity.
J. Cancer Res. Clin. Oncol. 110, 98-102 (1985).
- Schwartz, H.S., Garofalo, M., Sternberg, S.S., and Phillips, F.S.: Hydroxyurea: inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating liver of rats.
Cancer Res. 25, 1867-1870 (1965).
- Sell, S.: Distribution of α -fetoprotein- and albumin-containing cells in the livers of Fischer rats fed four cycles of N-2-fluorenylacetamide.
Cancer Res. 38, 3107-3113 (1978).
- Sinclair, W.K.: Hydroxyurea: differential lethal effects on cultured mammalian cells during the cell cycle.
Science 150, 1729-1731 (1965).
- Sinclair, W.K.: Hydroxyurea: effects on chinese hamster cells grown in culture.
Cancer Res. 27, 297-308 (1967).
- Slaga, T.J., Bowden, G.T., Shapas, B.G., and Boutwell, R.K.: Macromolecular synthesis following a single application of alkylating agents used as initiators of mouse skin tumorigenesis.
Cancer Res. 33, 769-776 (1973).

- Solt, D., and Farber, E.: New principle for the analysis of chemical carcinogenesis.
Nature 263, 701-703 (1976).
- Sporn, M.B., and Todaro, G.J.: Autocrine secretion and malignant transformation of cells.
New Engl. J. Med. 303, 878-880 (1980).
- Stäubli, W., Hess, R., and Weibel, E.R.: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell.
II. Effects of phenobarbital on rat hepatocytes.
J. Cell Biol. 42, 92-112 (1969).
- Stöcker, E.: Der Proliferationsmodus in Niere und Leber.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 50, 53-74 (1966).
- Swann, P.F., and Magee, P.N.: Nitrosamine-induced carcinogenesis. The alkylation of nucleic acids of the rat by N-methyl-N-nitrosourea, dimethylnitrosamine, dimethyl sulphate and methyl methanesulphonate.
Biochem. J. 110, 39-47 (1968).
- Swenberg, J.A., Bedell, M.A., Billings, K.C., Umbenhauer, D.R., and Pegg, A.E.: Cell-specific differences in O⁶-alkylguanine DNA repair activity during continuous exposure to carcinogen.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5499-5502 (1982).
- Tatematsu, M., Nagamine, Y., and Farber, E.: Redifferentiation as a basis for remodeling of carcinogen-induced hepatocyte nodules to normal appearing liver.
Cancer Res. 43, 5049-5058 (1983).

- Thomas, C.: Zur Morphologie der durch Diäthylnitrosamin erzeugten Leberveränderungen und Tumoren bei der Ratte.
Z. Krebsforsch. 64, 224-233 (1961).
- Todaro, G.J., Fryling, C., and De Larco, J.E.: Transforming growth factors (TGFs) produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor (EGF) receptors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5258-5262 (1980).
- Tuczek, H.V. und Rabes, H.M.: Autoradiographische Untersuchungen über intralobuläre Differenzen der Flußrate von Hepatozyten in das S-Kompartiment in Frühstadien nach partieller Hepatektomie.
Virchows Arch. Abt. B Zellpath. 15, 55-63 (1973).
- Tuczek, H.V., Skoruppa, W. und Rabes, H.M.: Zellkinetische Untersuchungen zur Interferenz zwischen Proliferations- und Funktionsstoffwechsel in der regenerierenden Rattenleber nach Applikation von Phenobarbital.
Virchows Arch. Abt. B Cell Path. 17, 347-361 (1975).
- Wachstein, M., and Meisel, E.: Histochemistry of hepatic phosphatases at a physiological pH with special reference to the demonstration of bile canaliculi.
Am. J. Clin. Pathol. 27, 13-23 (1957).
- Wagner, H.: Einfluß von Phenobarbital auf die Zellproliferation bei der Lebercarcinogenese.
Dissertation München, 1987.
- Wanson, J.C., de Ridder, L., and Mosselmans, R.: Invasiveness of hyperplastic nodule cells from diethylnitrosamine-treated rat liver.
Cancer Res. 41, 5162-5175 (1981).

Weisburger, J.H., Madison, R.M., Ward, J.M., Viguera, C., and Weisburger, E.K.: Modification of diethylnitrosamine liver carcinogenesis with phenobarbital but not with immunosuppression.
J. Natl. Cancer Inst. 54, 1185-1188 (1975).

Yarbro, J.W., Niehaus, W.G., and Barnum, C.P.: Effect of hydroxyurea on regenerating rat liver.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 19, 592-597 (1965).

Young, C.W., and Hodas, S.: Hydroxyurea: inhibitory effect on DNA metabolism.
Science 146, 1172-1174 (1964).

Young, C.W., Schochetman, G., and Karnofsky, D.A.: Hydroxyurea-induced inhibition of deoxyribonucleotide synthesis: studies in intact cells.
Cancer Res. 27, 526-534 (1967).

Yu, C.K., and Sinclair, W.K.: Cytological effects on chinese hamster cells of synchronizing concentrations of hydroxyurea.
J. Cell. Physiol. 72, 39-42 (1968).

LEBENS LAUF

7. September 1958 geboren in München als erstes Kind des Kinderarztes Dr. med. Dietmar Galm und der Kinderärztin Dr. med. Irmgard Galm, geb. Hartinger
- 1965 - 1969 Grundschule Memmingen-West
- 1969 - 1978 Bernhard-Strigel-Gymnasium Memmingen
- 29.06.1978 Abitur
- 1.07.78 - 30.09.79 Grundwehrdienst
- 1.10.79 - 30.09.80 Krankenpflegeschule am Kreiskrankenhaus Memmingen
- WS 1980/81 - SS 1986 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
- WS 1985/86 - SS 1986 Praktisches Jahr:
1. Tertial: Chir. Klinik der Universität München (Leiter: Prof. Dr. med. L. Schweiberer)
 2. Tertial: Staatl. Orthopädische Klinik München (Leiter: Prof. Dr. med. B. Rosemeyer)
 3. Tertial: Zentralklinikum Augsburg, 1. Med. Klinik (Leiter: Prof. Dr. med. D. Bolte)
- 13.11.1986 Approbation als Arzt
- 1.01.87 - 30.06.87 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Mikroskopische Anatomie der Anatomischen Anstalt der LMU München (Leiter: Prof. Dr. med. U. Welsch)
- seit 1.07.87 Assistenzarzt am Stadtkrankenhaus Memmingen, Abteilung für Anästhesie

